



# Détermination neurale et neuronale : implication des protéines de la superfamille Snail dans le lignage des soies mécanosensorielles chez la drosophile

Anne Roque

## ► To cite this version:

Anne Roque. Détermination neurale et neuronale : implication des protéines de la superfamille Snail dans le lignage des soies mécanosensorielles chez la drosophile. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066559 . tel-01207496

**HAL Id: tel-01207496**

**<https://theses.hal.science/tel-01207496>**

Submitted on 1 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité  
**Biologie Cellulaire et Développement**  
Ecole doctorale Complexité du Vivant

Présentée par  
**Anne Ramat**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Détermination neurale et neuronale : implication des protéines de la superfamille Snail dans le lignage des soies mécanosensorielles chez la drosophile.**

soutenue le 29 Septembre 2014 devant le jury composé de :

**Dr. Magalie Lecourtois** (Rapporteur)  
**Dr. Jean-René Huynh** (Rapporteur)  
**Dr. Cédric Maurange** (Examineur)  
**Dr. Pierre Savagner** (Examineur)  
**Pr. Nathalie Dostatni** (Président du Jury)  
**Dr. Michel Gho** (Directeur de thèse)



*A ma grand-mère Suzanne.*





## **Remerciements :**

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'être présents et d'évaluer mon travail de thèse. Je vous remercie également pour votre patience lors de l'attente de mes résultats de demandes de financement et de tous les problèmes logistiques qui en ont découlés. Je remercie particulièrement Magalie Lecourtois et Jean-René Huynh d'avoir accepté d'être rapporteur dans ce jury. En espérant que vous aurez pris plaisir à lire mon manuscrit ainsi que lors de la soutenance.

Je remercie également mon comité de thèse, Anne-Marie Prêt, Jean-René Huynh et Alain Zider pour leurs excellents conseils lors de nos réunions. Un merci tout particulier à Alain pour m'avoir conseillé l'équipe de Michel pour mon stage de master 2.

Je remercie également la Fondation pour la Recherche Médicale pour son soutien financier lors de ma 4<sup>ème</sup> année de thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe « Cycle et Détermination Cellulaires » pour ces 4 ans et demi passés avec vous. Après de vous j'ai découvert le véritable sens du mot équipe. Vous m'avez tous toujours soutenue et aidée lors des périodes « calmes » avec des conseils pour mes expériences, et lors des périodes difficiles, que ce soit pour une présentation, pour des réponses à des demandes de financement ou pour l'écriture du manuscrit et la soutenance de thèse. Vous avez toujours fait en sorte que je ne sois pas la seule étudiante après le départ de JérémY afin que je ne me sente pas trop seule. Tous, vous vous êtes intéressés en permanence à l'avancement de mes expériences et pas seulement lors des réunions de laboratoire. Vous avez partagé mon enthousiasme (parfois exubérant je le reconnais) quand j'avais de beaux résultats. Je souhaite à tout étudiant en thèse d'être entouré d'une aussi bonne équipe et de personnes aussi formidables. Pour moi, vous avez été des soutiens sans faille et cette thèse, c'est en grande partie à vous tous que je la dois. J'espère que ma future carrière vous rendra fiers de dire que j'ai débuté chez vous.



Un grand MERCI à Michel Gho pour m'avoir acceptée dans l'équipe et pour avoir dirigé mes travaux de thèse. Michel, même si ce n'était pas toujours facile de mettre la main sur toi quand tu disparaissais du labo, tu as toujours été disponible lorsque j'ai eu besoin de toi et de tes conseils. Tu as eu la patience de me faire découvrir de nombreuses expériences ou de discuter des travaux en cours. Tu as toujours respecté et encouragé mes idées et mon indépendance. Tu as composé avec mon caractère pas forcément facile (têtue moi ??) et tu as fait en sorte que cela devienne une force et non une faiblesse. Parfois tu m'as poussée dans mes retranchements mais c'était à chaque fois pour me montrer que j'étais capable d'aller plus loin et me donner confiance en moi. Surtout, afin que je puisse continuer encore un peu ce projet qui me tient tant à cœur, tu as fait tout ton possible pour que toutes les chances soient de mon côté et que toutes les solutions possibles soient explorées. Je ne te remercierai jamais assez pour ça. Pour faire bref, tu es un super chef et j'ai eu de la chance que tu encadres ma thèse !

Je tiens également à remercier le duo de choc Agnès Audibert et Sophie Louvet. Merci de m'avoir fait découvrir les arcanes de l'enseignement et de l'Université. J'ai découvert avec vous le métier d'enseignant/chercheur, comment il est parfois difficile de concilier les deux et la somme de travail, d'efforts et de sacrifices que cela demande mais également les joies et les satisfactions que cela apporte. Vous m'avez donnée l'envie de suivre vos traces et de ne pas être juste un chercheur. Malgré vos journées surchargées, vous avez toujours pris le temps de relire les textes que j'avais à écrire, de discuter autour d'un café ou d'une table de repiquage et de vous enthousiasmer avec moi devant le spinning disc. Aussi je vous remercie pour tous les conseils très judicieux que vous avez apportés à chacune de mes présentations et qui reflètent votre talent pour enseigner et transmettre aux autres. Je vous souhaite bon courage pour vos nouvelles fonctions pédagogiques qui, j'en suis persuadée, vont améliorer, voir révolutionner, l'enseignement à l'UPMC.

Agnès, je te remercie pour toutes les discussions que nous avons eues sur la science ou la vie en générale, pour tous tes conseils pertinents que ce soit pour les expériences (qui ont toujours débouchés sur des résultats intéressants) ou pour l'enseignement. Tu m'as toujours remotivée et soutenue dans les moments les plus durs de ces 4 années. Tes traits d'humour et la gentillesse dont tu m'entourais vont beaucoup me manquer. Je te remercie également d'avoir accepté que je participe aux TP drosos que tu organises tous les ans et qui ont été pour moi une réelle source de plaisir et m'ont



beaucoup apporté au niveau pédagogique. J'ai pu ressentir une liberté lors de cette expérience que peu de Chargés de Mission d'Enseignement ont l'occasion d'éprouver. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée lors des expériences de biologie moléculaire et de biochimie. Et surtout je te remercie du fond du cœur d'avoir réussi à me débloquent lors de l'écriture de la discussion de ce manuscrit.

Sophie, je te remercie pour toutes nos discussions au laboratoire et pendant le trajet du RER. Tu m'as tenu compagnie dans « l'aquarium » (et d'ailleurs de ce fait nous avons fréquemment partagé des rhumes pendant l'hiver !), t'intéressant à toutes les images que j'analysais, en étant contente pour moi quand mes travaux avançaient et en répondant patiemment à toutes les questions que je pouvais te poser. De même nos retours ensemble dans le RER, les discussions sur la science, le monde scientifique, universitaire et la vie en général ont été de réels plaisirs. Je te remercie beaucoup pour tout ça et mes trajets de retour à la maison lors du post-doc vont être beaucoup plus tristes. Je te remercie également d'avoir contribué avec Agnès à développer mes compétences dans le domaine de la biochimie, une tâche en soi assez difficile. Et finalement merci pour tes soirées jeux de société où j'ai découvert les meilleurs jeux que je connaisse !

Je remercie tout particulièrement Françoise Simon, le pilier du laboratoire. Françoise, que ce soit pour vos conseils en gestion de mouches ou pour toutes les bonnes choses que vous nous avez rapportées de vos vacances à Valoire, je vous remercie fortement. Les nounours au chocolat blanc et les énormes fraises en sucre ont été parfois ma seule source de survie, me permettant d'attendre que le chef ait (enfin !) faim. Depuis mes débuts au laboratoire, vous m'avez prise sous votre aile pour me guider, me conseiller jusqu'à ce que je vole de mes propres ailes. En partie pour ne pas me laisser seule avec les chefs, vous avez retardé votre départ à la retraite (pourtant bien méritée), évitant ainsi que le labo soit envahi par le chaos (et également vide une partie de la semaine). Toutes nos discussions lors du tri des mouches au sujet de la famille, de la vie, des chiens, votre bonne humeur, votre esprit foncièrement bon et doux, tout cela va énormément me manquer par la suite.

Merci à Jérémy Sallé, ancien doctorant du laboratoire, qui m'a guidée dans mes premiers pas de thésard. Tu m'as fait découvrir de nombreux sites essentiels à la décompression de manip (« tu mourras moins bêtes mais tu mourras quand même »



restant un de mes préférés). Tu m'as toujours impressionnée par ton esprit curieux, rigoureux, ta maturité, me donnant l'envie de m'améliorer pour être ton digne successeur.

Un grand merci à Laure Etourneaud pour avoir été un soutien dans l'Unité et en dehors ainsi que pour tous les bons jeux de société que tu m'as fait découvrir.

Merci à Isabelle Becam de m'avoir « initiée » à la drosophile, un modèle que je n'ai cessé d'aimer depuis. C'est également après avoir effectué mon stage de L3 avec toi que j'ai eu envie de travailler dans la recherche.

Je remercie également Viviane Peltier, qui devant notre désarroi lors des vacances de Françoise, nous aidait à trouver ce dont nous avions besoin et prenait soin de nous comme si nous étions dans son équipe.

Merci à Maïté Lusquinos pour son efficacité foudroyante à résoudre les problèmes administratifs ou matériels dès qu'ils se présentaient, à Rita, Emilie et Elisabeth pour leur gestion très efficace du milieu de mouche et des solutions ainsi que pour leur aide concernant tout ce qui touchait à la verrerie et à l'autoclave.

Merci à toutes les équipes droso de l'Unité pour nos échanges lors du journal club ou de la retraite annuelle, tout particulièrement à Bruno pour sa perpétuelle bonne humeur et son aide lors des coulages de milieu de mouche, à Frédérique pour sa gentillesse et ses conseils, à Emmanuelle pour m'avoir enseigné le ChIP et à Neels pour ses « journal club » toujours passionnants.

Un grand merci à tous les doctorants de l'Unité et plus particulièrement à Mélinée pour avoir partagé avec moi la gestion du Club des docs. Merci également à Marius et Audrey d'avoir pris la relève. Merci également aux anciens doctorants Julien et Augustin pour leur humour et leur bonne humeur contagieuse.

Noun, nos conversations téléphoniques ont toujours été un réel réconfort pour moi. De même, les vacances que j'ai passées avec toi ont été les plus reposantes de ces quatre dernières années, où je pouvais vraiment décompresser et redevenir





l'adolescente que tu as connue. Et je suis sûre qu'il en sera de même quand je viendrai te voir à Londres pendant mon post-doc ! Je te remercie pour tout ça.

Ma petite Julie, mon alter-ego en mieux, je ne vois pas de manière suffisante de te remercier de tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as accompagné au sport, au DIF, au Frog, à l'Indiana et un peu partout dans le monde. Tu crois plus en moi que moi-même (mais la réciprocité est vraie !). Ces quelques mois avec toi à Melbourne et moi à Paris m'ont fait mesurer à quel point notre amitié était importante pour moi. Allez ! Dans dix ans, on se réunit et on monte une équipe de drosophile ensemble !

Je remercie également toute ma famille pour leur aide et leur soutien durant ces 4 années. Mamou, un grand merci de ton soutien pendant mes études. Tu as cru en moi, m'a soutenu en m'encourageant à aller plus loin, à m'émanciper et à devenir une femme forte, tout comme toi. Tatie Josie, je te remercie pour le soutien que tu as apporté à mes parents en mon absence et pour nous avoir toujours accueilli lors de nos trajets vers Montauban. Catherine et Patrick, je vous remercie pour avoir supporté le stress que je ramenaient lors de nos week end à Limetz, pour votre intérêt dans mon travail et pour votre soutien.

Un énorme merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel durant toutes mes études et pour avoir toujours cru en moi. En soutien pour moi, vous êtes devenus de féroces défenseurs de la recherche fondamentale et essayez de convaincre toutes les personnes aux alentours de Montauban d'adhérer à cette idée. Même si cela a été très dur d'être loin de vous toutes ces années, vous avez toujours approuvé mes choix de carrière, m'encourageant toujours à réaliser mes rêves. Je n'en serai pas là aujourd'hui sans vous à mes côtés. Je vous aime et j'espère toujours réussir à vous rendre fiers que je sois votre fille. Merci également d'avoir corrigé les fautes d'orthographe de mon manuscrit dans un délai si court... C'est votre pharmacien qui doit me remercier vu toutes les boîtes d'ibuprofène que vous avez achetées pour cette lecture !

Merci à Fluffy, ma petite boule de poil qui a toujours réussi à me faire rire, sourire et à me mettre de bonne humeur.



Et, le meilleur pour la fin, je remercie ma tendre moitié Sylvain Roque. Mon cœur, je ne vois pas de mot assez fort pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Pendant mes années de master et de thèse, tu as été mon soutien inconditionnel. Tu as toujours vu le meilleur en moi et le pire ne t'a jamais fait peur. Cette passion commune de la science nous a rapproché et soudé, mais c'est toi qui as ravivé mon attachement pour la science dans mes moments de doutes. Tu es quelqu'un d'exceptionnel tant dans le domaine professionnel (tous les labo où tu es passé t'adorent et regrettent ton départ !) que dans le domaine personnel. Il me tarde de commencer cette nouvelle vie avec toi en Ecosse, même si je dois endurer tes débuts à la cornemuse. Merci pour tout. Je t'aime.

Merci également à tous ceux que j'aurais pu oublier mais si ce n'est pas par écrit, c'est gravé dans mon esprit. Et une mention spéciale également pour toutes les mouches que j'ai torturées pendant toutes ces années. Je n'oublie pas que tout ceci est grâce à vous.



# Sommaire :

<b>Préambule :</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
I. La détermination cellulaire et la mise en place de l'identité. ....	2
1. Quelques définitions .....	2
(1) Potentialité cellulaire.....	2
(2) Spécification Versus Détermination.....	3
(3) Différenciation cellulaire.....	3
2. Les mécanismes de détermination cellulaire .....	3
(1) Les signaux intrinsèques.....	4
a. Division asymétrique : les neuroblastes de drosophile .....	4
b. Facteurs temporels : formation du système nerveux central .....	7
(2) Les signaux extrinsèques .....	9
a. Morphogènes sécrétés : établissement du compartiment antérieur et du	
compartiment postérieur dans le disque d'aile de la drosophile .....	10
b. Contact cellule - cellule : la voie de signalisation Eph-Ephrin.....	11
3. De la détermination à la différenciation .....	12
(1) Le système olfactif de la drosophile .....	13
(2) Guidance de la dendrite des PNs.....	13
(3) Guidance de l'axone des ORNs.....	14
(4) Connexion des ORNs et des PNs.....	15
II. La voie de signalisation Notch.....	15
1. L'émission et la transduction du signal Notch.....	16
(1) Caractéristiques du récepteur Notch .....	16
(2) La liaison de Notch à ses ligands DSL .....	16
(3) La transduction du signal Notch .....	17
a. Les gènes cibles de la voie Notch : une expression contexte-dépendante.....	18
b. Mise en évidence de la bivalence des protéines CSL.....	19
c. La transformation du complexe répresseur en complexe activateur .....	21
2. Notch au cours du développement.....	22
(1) Le système nerveux .....	22
(2) La frontière dorso-ventrale du disque d'aile .....	24
(3) Cellule souche intestinale .....	25
3. Les régulateurs de la voie Notch .....	26
(1) Régulation de l'émission du signal.....	27
a. Le trafic intracellulaire.....	27
b. Trafic du ligand dans la cellule émettrice du signal .....	27
c. Trafic du récepteur dans la cellule réceptrice du signal.....	28



(2) Régulation de la réponse transcriptionnelle au signal Notch .....	29
a. Action du complexe activateur en synergie avec d'autres facteurs.....	30
b. Répression de la voie Notch par remodelage de la chromatine.....	31
III. Le modèle : les soies mécanosensorielles de la drosophile .....	32
1. Le développement de la drosophile .....	32
(1) Cycle de vie.....	33
(2) L'embryogenèse (Fig.18).....	33
(3) Vie larvaire .....	34
(4) La métamorphose : exemple de la formation de l'aile et du notum .....	34
2. Le lignage de soies mécanosensorielles .....	35
(1) Description du lignage.....	35
(2) Mécanismes de mise en place de l'identité cellulaire dans le lignage des soies	
mécanosensorielles .....	36
a. Activation différentielle de Notch.....	36
b. Divisions asymétriques.....	38
c. Un facteur de transcription temporel ? .....	38
(3) Le paradoxe : à la recherche de facteurs contrôlant l'identité cellulaire .....	39
IV. La superfamille Snail.....	40
1. Caractéristiques des protéines de la superfamille Snail .....	40
(1) Famille Scratch .....	42
(2) Famille Snail/Slug .....	42
2. Processus cellulaires régulés par la superfamille Snail.....	43
(1) Morphogenèse et migration cellulaire .....	43
a. Gastrulation de l'embryon .....	43
b. Migration des crêtes neurales.....	43
c. Migration des neurones lors de la formation du cortex de la souris.....	44
d. Capacités métastatiques des cellules cancéreuses .....	45
(2) Maintien de l'identité précurseur.....	45
a. Mise en place de l'identité mésodermique et inhibition de la division lors de la	
migration cellulaire.....	45
b. Maintien de la diploïdie dans les cellules précurseurs .....	46
c. Régulation de la division et maintien de l'identité des cellules souches neurales,	
intestinales et germinales .....	46
(3) Mise en place de l'identité neurale et neuronale .....	48
a. Scratch et le système nerveux périphérique embryonnaire.....	48
b. Worniu et les neuroblastes larvaires.....	49
c. Escargot et les neurones chemosensoriels chez l'adulte .....	49
d. Redondance de la famille Snail dans les neuroblastes embryonnaires .....	49
e. Slug et Esg : conservation du rôle de promoteur de l'identité neurale .....	50
3. Interaction des facteurs Snail et de la voie Notch.....	50





(1) Régulation de Delta par Snail .....	50
(2) Interaction physique de Notch et Snail .....	52
(3) Régulation de l'expression de Snail par Notch .....	52
V. Projet de thèse .....	53
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>55</b>
I. Lignées de mouches utilisées .....	56
II. Le système UAS/Gal4 (Fig.29).....	57
III. Analyse clonale .....	58
1. Clones mitotiques .....	58
2. Clones de surexpression .....	59
IV. Immunomarquage.....	59
1. Procédures expérimentales.....	59
(1) Dissection de notum.....	59
(2) Dissection du disque d'aile .....	60
(3) Immunomarquage d'embryon.....	61
2. Anticorps utilisés.....	61
3. Incorporation d'EdU .....	63
V. Dissection de nota et d'ailes adultes.....	63
1. Dissection de nota.....	63
2. Dissection d'aile adulte.....	63
VI. Imagerie .....	64
1. Observations des nota et ailes adultes.....	64
2. Observations de tissus fixés immunomarqués.....	64
3. Observations de notum <i>in vivo</i> .....	64
(1) Préparation des pupes à l'imagerie <i>in vivo</i> .....	64
(2) Imagerie <i>in vivo</i> (Time-Lapse) .....	64
VII. Quantification des axones .....	65
1. Quantification de la longueur des axones.....	65
2. Quantification des défaut d'arborisation axonale.....	65
<b>Résultats.....</b>	<b>66</b>
I. Escargot et Scratch participent à la formation du sous-lignage neural dans les soies mécanosensorielles de la drosophile.....	67
1. Escargot et Scratch régulent l'identité neurale et neuronale dans les organes sensoriels de la drosophile.....	67
2. Escargot et Scratch lors de la formation des organes sensoriels de l'embryon de drosophile 70	
3. Analyse du réseau impliqué dans la détermination neuronale .....	71
(1) Etude de Nerfin-1 dans les organes mécanosensoriels .....	71



(2) Etude de miR-279 dans le lignage des soies mécanosensorielles .....	73
(3) Le pic initial de Pros est nécessaire à la détermination neuronale dans le lignage des soies mécanosensorielles.....	75
II. Mécanisme d'interaction entre Escargot, Scratch et la voie Notch .....	76
1. Escargot et Scratch ne régulent pas l'asymétrie de la division de la cellule pI. ....	77
2. Escargot contrecarre l'activation de la voie Notch.....	78
3. Escargot n'interagit pas directement avec N <sub>intra</sub> pour moduler la réponse à l'activation de Notch. 80	
4. Escargot diminue la réponse transcriptionnelle induite par l'activation de la voie Notch 81	
III. Escargot module le cycle et la survie cellulaires dans le lignage des soies mécanosensorielles.....	84
1. La surexpression d' <i>escargot</i> provoque de nombreuses divisions ectopiques .....	85
2. La surexpression d' <i>escargot</i> provoque-t-elle une mort cellulaire accrue en réprimant l'expression du facteur Cut ?.....	86
IV. Escargot et la morphogenèse cellulaire dans le disque d'aile et les soies mécanosensorielles.....	87
1. Expression d' <i>escargot</i> et <i>scratch</i> dans le disque d'aile .....	87
1. Escargot est impliqué dans l'éversion du disque d'aile et la fermeture thoracique .....	88
2. Escargot et Scratch régulent l'affinité cellulaire dans le disque d'aile.....	89
3. Escargot et Scratch ne contrôlent pas la morphogenèse des cellules pIIa et pIIb.....	90
<b>Discussion des résultats.....</b>	<b>92</b>
I. Mécanisme d'interaction entre Escargot, Scratch et la voie Notch .....	93
1. Répression des gènes cibles de Notch par Esg et Scrt.....	93
2. Mécanisme moléculaire de répression des gènes cibles de Notch par Esg et Scrt.....	95
II. Mise en place de l'identité neuronale : Réseau de régulation entre Escargot, Prospero, Nerfin-1, Elav et miR-279.....	96
<b>Discussion générale.....</b>	<b>100</b>
I. Vers l'identification des déterminants cellulaires de l'identité pIIb .....	101
1. (Re)Définition d'un déterminant cellulaire .....	101
2. Acquisition de l'identité du précurseur secondaire pIIb .....	104
II. Redondance entre la famille Snail et la famille Scratch.....	106
1. Redondance entre Escargot et Scratch dans le lignage des soies mécanosensorielles 106	
(1) Modélisation de la relation de redondance entre Esg et Scrt.....	106
(2) Implication de ce modèle pour les organes mécanosensoriels .....	107
2. Redondance entre Escargot et Scratch dans d'autres systèmes.....	108
III. Génération de la diversité cellulaire au cours du développement .....	110



1. Maintien de l'activation différentielle de la voie Notch au cours du développement : un niveau de régulation supplémentaire.....	110
2. Ambivalence des facteurs régulant la détermination de l'identité cellulaire : exemple du neurone et de la cellule gaine .....	112
<b>Bibliographie .....</b>	<b>115</b>



# Nomenclature :

Ac : Achaete

ADN : acide désoxyribonucléique

APF : après formation de la pupe

ARN : acide ribonucléique

AS-C : complexe Achaete- Scute

Baz : Bazooka

bHLH : facteur de transcription basiques de type hélice-boucle-hélice

Brat : Brain tumor

Caps : Capricious

Cas : Castor

Ces-1 : Cell death specification 1

CDK1 : Kinase cycline-dépendante 1

ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine

ChIP-seq : séquençage de l'immunochromatine précipitée

Ci : Cubitus interruptus

CtBP : C-terminal Binding Protein

CSL : pour CBF1-Su(H)-LAG-1, les orthologues de Su(H)

Dx : Deltex

Dpp : Décapentaplegic

DSL : pour Delta-Serrate-LAG-2, représente les ligands de Notch

EB : entéroblaste

EC : entérocyte

ee : cellule sécrétrice

ELAV : Embryonic Lethal Abnormal Vision

EMT : transition épithélium-mésenchyme

Esg : Escargot

E(spl) : Enhancer of split

FISH : Hybridation *in situ en* Fluorescence

FLP : Flippase

FRT : Flippase Recognition Target

GFP : Green fluorescent Protein

GMC : cellule mère ganglionnaire





Grh : Grainyhead  
GSC : cellule souche germinale  
Hb : Hunchback  
HDAC : Histone déacétylase  
Hh : Hedgehog  
HP1 : Heterochromatin Protein 1  
INP : progéniteur neural intermédiaire  
ISC : cellule souche intestinale  
JNK : c-Jun N-terminal Kinase  
Kr : Krüppel  
Mam : Mastermind  
Mib : Mindbomb  
NB : neuroblaste  
Nerfin-1 : Nervous finger 1  
Neur : Neuralized  
N<sub>intra</sub> : forme intracellulaire active du récepteur Notch  
NSC : cellule souche neurale  
ORN : neurone sensible aux odeurs  
Ptc : Patched  
PDM : Pou Domain protein  
Pins : Partner-of-inscutable  
Pon : Partner-of-Numb  
PN : interneurone  
Pros : Prospero  
Repo : Reversed polarity  
RFP : Red Fluorescent Protein  
RNAi : ARN interférence  
Robo : Roundabout  
Scrt : Scratch  
Sc : Scute  
Sim : Single minded  
Sna : Snail  
Spdo : Sanpodo  
Su(Dx) : Suppressor of Deltex



Su(H) : Suppressor of Hairless

Ten : Teneurine

TTF : Facteur de transcription temporel

Ubx : Ultrabithorax

Wg : Wingless

Wor : Worniu



**Préambule :**



La diversité cellulaire est une caractéristique fondamentale des organismes pluricellulaires. L'émergence des organismes pluricellulaires coïncide avec celle des cellules spécialisées. Ces cellules, structurées en tissus et organes, assurent les fonctions vitales nécessaires à la survie de l'organisme. Mise en place progressivement au cours du développement, la spécialisation des cellules repose sur le processus de détermination cellulaire.

La détermination cellulaire consiste en un engagement des cellules vers un destin donné et permet de générer une multitude de types cellulaires différents. Ce processus est initié par des facteurs internes ou externes à la cellule. Ils déclenchent une cascade d'activation aboutissant à la production d'une combinaison spécifique de facteurs, un « code moléculaire » propre à chaque identité. Quels sont ces facteurs ? Comment contrôlent-ils la mise en place de l'identité cellulaire ? A partir du moment où la cellule est engagée dans une identité cellulaire, elle développe les caractéristiques structurelles propres à l'identité (par exemple le neurone développe des dendrites et des axones), autrement dit elle se différencie. Quels sont les facteurs qui influencent la mise en place de l'identité cellulaire ? En quoi la détermination cellulaire influence-t-elle le déroulement de la différenciation ?

Le laboratoire où j'ai effectué ma thèse a pour but de décrypter les mécanismes contrôlant l'acquisition de l'identité cellulaire. A cette fin, un lignage simple, stéréotypé, où cycle et détermination cellulaires s'entrecroisent est analysé : le lignage des soies mécanosensorielles de la drosophile. Néanmoins, malgré sa simplicité, les facteurs permettant de générer cinq types cellulaires différents à partir d'une cellule précurseur unique ne sont pas totalement identifiés. En effet, s'il est déjà connu que l'activation différentielle de la voie Notch à chaque division est essentielle à l'acquisition des différentes identités, ce mécanisme utilisé de manière itérative à chaque division n'explique pas l'obtention d'une telle diversité cellulaire.

Au cours de ces quatre années de thèse, j'ai eu pour objectif d'identifier des facteurs participant à la mise en place de l'identité dans le sous-lignage neural des soies mécanosensorielles. Pour cette étude, mon intérêt s'est porté sur les protéines de la superfamille Snail, des facteurs connus pour leur implication dans la neurogenèse. Mes expériences montrent que deux de ces facteurs, Escargot et Scratch, sont spécifiquement exprimés dans le sous-lignage neural. Leur analyse fonctionnelle m'a permis de montrer qu'Esg et Scrt sont requis à deux moments distincts de la formation de ce sous-lignage : (i) d'une part ils participent de manière redondante au maintien l'identité du précurseur

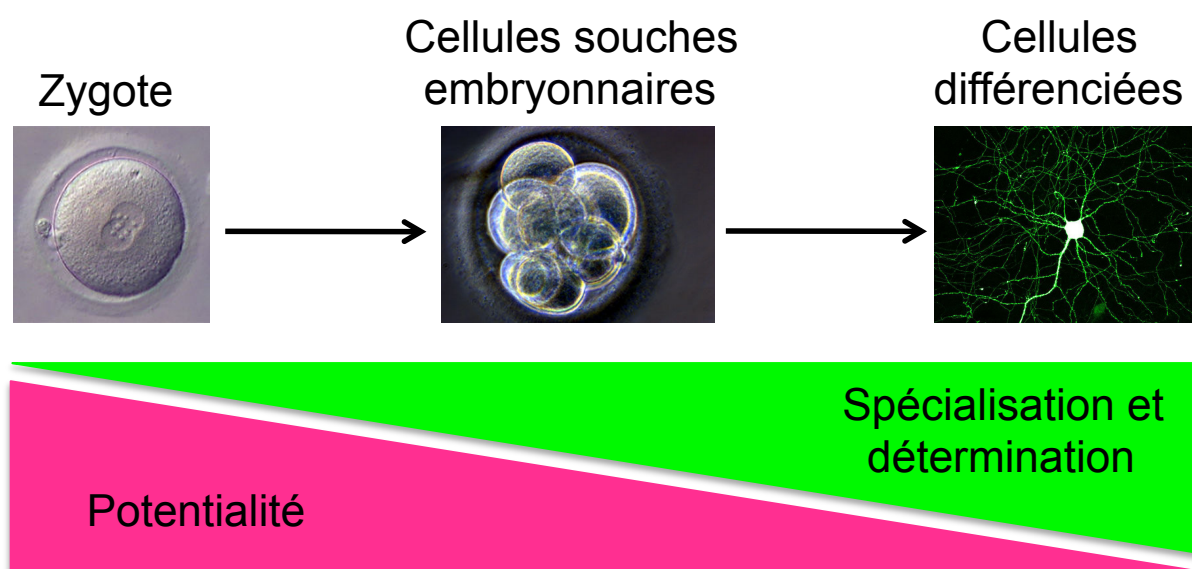




neural p11b en contrecarrant les fluctuations supraliminales de l'activité de la voie Notch. Mes données suggèrent également qu'Esg et Scrt permettraient ce maintien en réprimant l'expression des gènes cibles de la voie Notch, diminuant ainsi la compétence de cette cellule à répondre au signal Notch. (ii) d'autre part Esg et non Scrt est impliqué dans la différenciation neuronale. Cette régulation s'effectuerait par le contrôle de la dynamique d'expression de facteurs impliqués dans la détermination neuronale tel que Prospero.



# Introduction



**Figure 1 : Relation entre potentialité cellulaire et spécification de l'identité**

## **I. La détermination cellulaire et la mise en place de l'identité.**

Les organismes pluricellulaires sont composés de nombreux types cellulaires différents possédant des caractéristiques structurales et moléculaires distinctes. La formation et l'organisation spatiale des cellules en organes et tissus sont des étapes finement contrôlées par des processus clés (divisions, détermination, apoptose et morphogenèse cellulaires) lors du passage de l'embryon à l'adulte. Ce premier chapitre sera consacré à l'un de ces processus qui est au cœur de mon projet de thèse : la détermination cellulaire.

### **1. Quelques définitions**

#### *(1) Potentialité cellulaire*

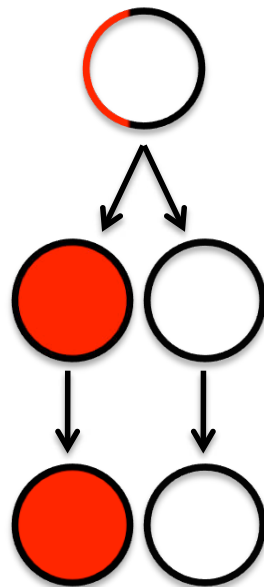
La potentialité d'une cellule est sa capacité à produire différents types cellulaires. Le zygote est une cellule totipotente, autrement dit elle possède le plus haut niveau de potentialité (Fig.1, gauche). Elle est capable de générer tous les types cellulaires présents chez l'adulte et de les organiser pour générer un organisme entier. Les cellules souches embryonnaires, issues des premières divisions du zygote, sont dites pluripotente (Fig.1, milieu). Elles possèdent le même niveau de potentialité que le zygote mais elles ne sont plus capables d'organiser ces cellules pour générer un organisme entier.

Au fur et à mesure des divisions, les cellules se spécialisent et leur potentialité décroît. Elles deviennent multipotentes et ne peuvent produire qu'une fraction du panel des types cellulaires présents chez un organisme.

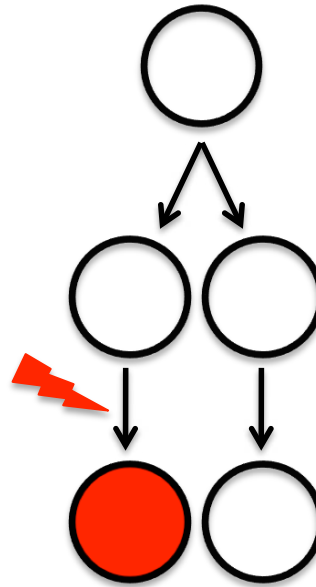
A la fin du développement, la plupart des cellules sont spécialisées (Fig.1, droite). Elles ne sont capables de produire qu'un seul type cellulaire, une identité terminale avec des caractéristiques précises. Seules les cellules souches gardent une forte potentialité cellulaire et sont capables de produire un grand nombre de types cellulaires. Elles permettent ainsi le renouvellement des tissus et la réparation de lésions.

Toutefois il est à noter que la perte progressive de potentialité implique un passage par des états intermédiaires avant d'aboutir à l'identité terminale et de développer les caractéristiques propres à la cellule mature. Ainsi, par exemple, un zygote ne devient pas directement un neurone. Il adopte d'abord l'identité de cellules intermédiaires menant à l'identité neuronale, autrement dit le lignage neuronal.

A Signal intrinsèque



B Signal extrinsèque



**Figure 2 : Les différents types de mécanisme de détermination cellulaire**

Schéma des mécanismes de détermination intrinsèque (A) et extrinsèque (B). (A) Les signaux intrinsèques correspondent à une variation interne de la cellule qui conduit à son changement d'identité. (B) Les signaux extrinsèques (éclair rouge) sont apportés par l'environnement de la cellule.

## (2) *Spécification Versus Détermination*

L'engagement d'une cellule vers une identité cellulaire peut être découpé en deux phases : la spécification et la détermination. La première étape, la spécification, est un état transitoire et réversible. La cellule commence à s'engager dans une voie mais un retour à l'état précédent est toujours possible. La deuxième étape, la détermination, est un engagement irréversible de la cellule vers une identité cellulaire. Elle ne correspond pas à un changement morphologique visible de l'état de la cellule. Au niveau moléculaire, cela aboutit à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui vont contrôler l'activation ou la répression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules.

## (3) *Différenciation cellulaire*

La différenciation correspond à la mise en place des caractéristiques moléculaires et structurales correspondantes au type cellulaire induit lors de la détermination. Ce processus implique généralement des changements de la morphologie cellulaire. Par exemple, pour un neurone cela correspondra au développement des projections cytoplasmiques (appelées neurites) et à leur connections avec l'environnement cellulaire.

### **2. Les mécanismes de détermination cellulaire**

Le choix de la cellule d'une identité donnée, versus tous les autres destins possibles, est gouverné par des signaux reçus par celle-ci lors de sa détermination. On distingue deux types de signaux : ceux provenant de la cellule elle-même (intrinsèques, Fig.2A) et ceux produits par l'environnement (extrinsèques, Fig.2B). La combinaison de ces différents messages enclenche un programme de différenciation précis. La variation ou l'altération d'un seul de ces signaux aboutit à la production d'un type cellulaire complètement différent pouvant ainsi remettre en cause l'intégrité/la fonctionnalité d'un tissu.

A quoi correspondent exactement ces signaux intrinsèques et extrinsèques ? Comment génèrent-ils des identités cellulaires différentes ? Comment sont-ils régulés ? Dans cette partie, en prenant comme exemples différents systèmes ayant beaucoup contribué dans la réponse à ces questions, je vais résumer les connaissances majeures sur les facteurs contrôlant la détermination cellulaire.





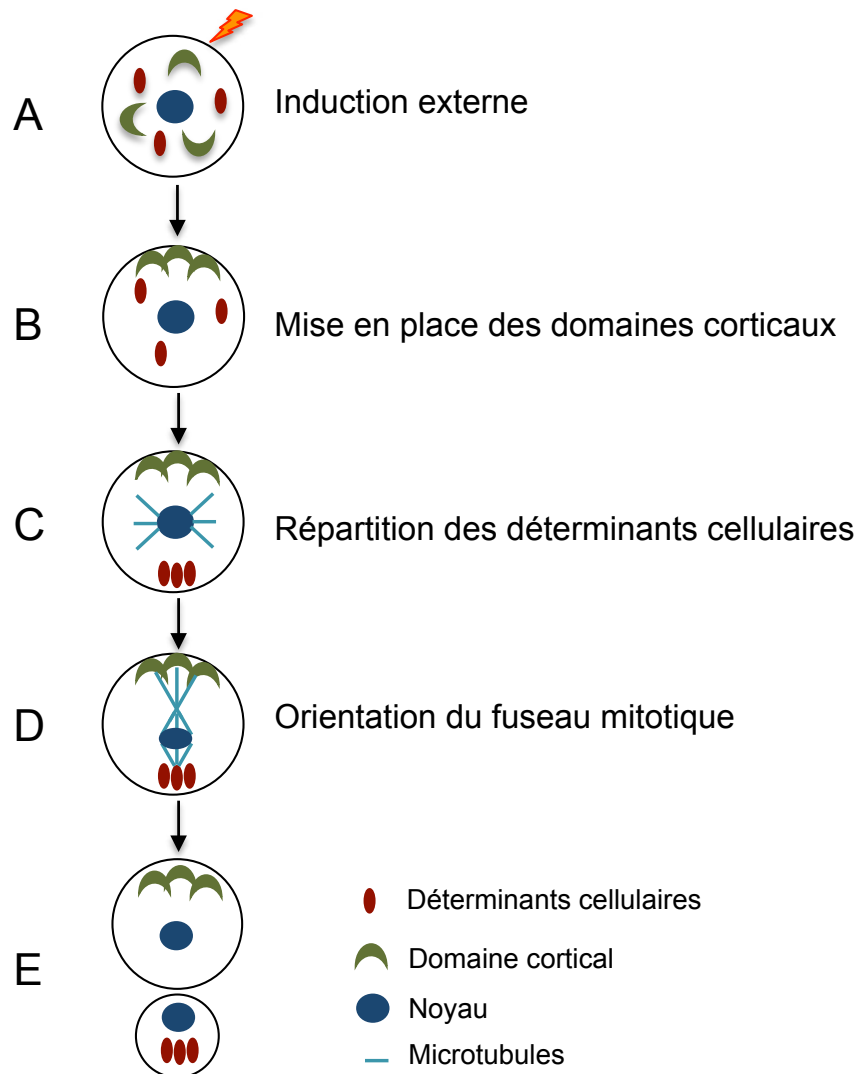
## (1) *Les signaux intrinsèques*

Le système nerveux est probablement le tissu le plus diversifié en terme de types cellulaires. Outre la production de cellules gliales, les cellules souches neurales (NSCs) donnent naissance à des centaines de types de neurones différents (variations dans la forme, dans le nombre de projections, dans les facteurs exprimés), générant ainsi les neurones et les cellules gliales à l'origine du cerveau et de la colonne vertébrale. Le nombre et la position de chaque type de neurones sont très précis et stéréotypés, avec des connexions neuronales bien définies. Or cette diversité repose en partie sur deux mécanismes de détermination intrinsèques établis dans les NSCs : la répartition asymétrique de facteurs de détermination lors de la division et la variation temporelle de l'expression de facteurs de transcription. La formation du système nerveux central, et plus particulièrement les NSCs, me serviront donc pour illustrer ces deux types de signaux intrinsèques.

### a. Division asymétrique : les neuroblastes de drosophile

Dans un schéma de division cellulaire classique, la cellule mère génère deux cellules filles identiques du point de vue génétique et qui acquièrent la même identité. Or, la définition même de cellule souche est en contradiction avec ce modèle. En effet, une cellule est qualifiée de « souche » lorsqu'elle est capable de s'autorenouveler tout en donnant naissance à une cellule qui adopte un destin différent. Ainsi, bien qu'ayant héritées du même contenu génétique, les cellules filles n'ont pas la même identité : l'une conserve le caractère « souche » alors que l'autre se spécialise. Comment cette différence d'identité est-elle générée ?

Les NSCs de la drosophile, ou neuroblastes, sont présents lors de deux phases du développement (embryonnaire et larvaire) avant de disparaître lors du passage de la larve à l'adulte (pupaison). Lors de l'embryogenèse, les neuroblastes sont sélectionnés parmi les cellules du tissu neuro-épithélial grâce au processus d'inhibition latérale (voir introduction, chapitre II.2.1 pour plus de détails). Après leur sélection, alors que les autres cellules voisines acquièrent l'identité épithéliale, les neuroblastes sont caractérisés par une délamination vers l'intérieur de l'embryon. A chaque division, le neuroblaste génère une large cellule apicale qui garde l'identité « souche » et une petite cellule basale appelée « cellule mère ganglionnaire » (GMC). Par la suite, la GMC, considérée comme un progéniteur intermédiaire, se divise une nouvelle fois, donnant



**Figure 3 : Etapes majeures de la division asymétrique**

Illustration des étapes majeures de la division asymétrique : polarisation de la cellule grâce à un signal externe (A), mise en place des domaines corticaux en accord avec ce signal (B). Les domaines corticaux dirigent la répartition à chaque pôle des déterminants cellulaires (C) et l'orientation du fuseau mitotique (D), conduisant à la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires (E).

Adapté de Goncsy, 2008.

naissance à des cellules neurales différenciées (neurones ou cellules gliales) (revue par Knoblich, 2001).

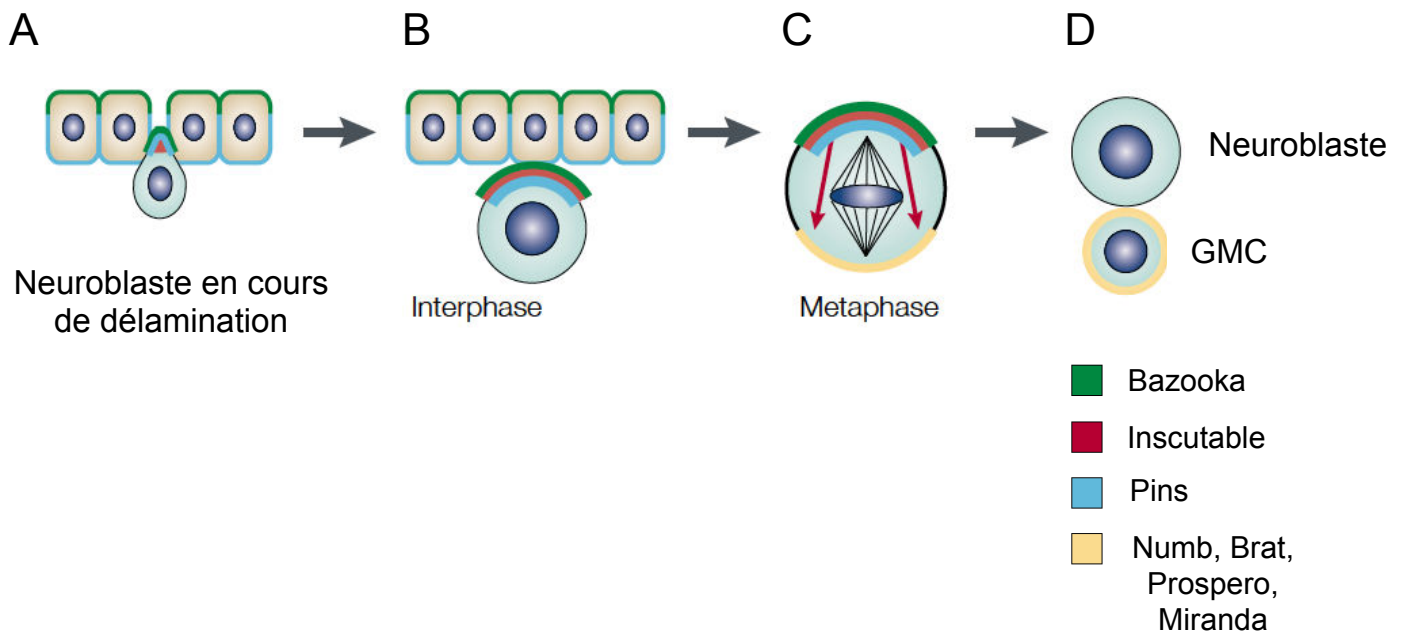
Des études ont montré que, lors de la division, le neuroblaste génère deux cellules filles qui n'héritent pas du même contenu cytoplasmique. Ce processus, appelé division asymétrique, est à l'origine des différences d'identités résultantes. Quels sont les facteurs hérités par chacune des cellules filles ? Par quel mécanisme sont-ils répartis de manière asymétrique au moment de la division ? Comment induisent-ils des identités différentes ?

Une altération de l'asymétrie des divisions des neuroblastes conduit à des défauts de mise en place de l'identité des cellules filles. Ainsi on observe une hyperprolifération du tissu due à une augmentation du nombre de neuroblastes ou bien à une hypotrophie du système nerveux à cause de leur différenciation précoce. Sur ces critères, de nombreux facteurs impliqués dans l'asymétrie des divisions ont pu être mis à jour et ont permis de broser une image plus claire du processus.

La division asymétrique peut être décomposée en quatre étapes majeures (Fig.3):

- (1) La cellule se polarise en fonction des signaux extérieurs reçus (par exemple la polarité du tissu), brisant la symétrie de la cellule (Fig.3A) ;
- (2) Un domaine cortical est mis en place à un pôle de la cellule suite à la réception du signal de polarisation, créant un axe de polarité (Fig.3B).
- (3) Le domaine cortical initie une accumulation asymétrique de déterminants cellulaires à chaque pôle de la cellule (Fig.3C).
- (4) Enfin le fuseau mitotique, orienté par les protéines du domaine cortical, s'aligne parallèlement à l'axe de polarité (Fig.3D), permettant ainsi la ségrégation inégale des déterminants cellulaires dans les cellules filles (Fig.3E).

Contrairement à certain modèle de division asymétrique où la cellule se polarise suite à un signal externe, le neuroblaste hérite lors de sa délamination de la polarité apico-basale déjà présente dans le tissu neuro-epithelial (Fig.4A) (Schober et al., 1999 ; Wodarz et al., 1999). Ainsi il conserve au pôle apical la localisation d'un complexe protéique cortical composé des protéines Bazooka (Baz, orthologue de Par3), DmPar6 et DaPKC (une protéine kinase C atypique) (Fig.4B).



**Figure 4 : Division asymétrique du neuroblaste embryonnaire de drosophile**

Schéma de la division du neuroblaste embryonnaire de drosophile. Apical en haut, basal en bas. (A) Le neuroblaste délamine de l'épithélium et hérite de la polarité apico-basale du tissu. (B) Le neuroblaste, en accord avec sa polarité, forme un complexe apical composé de Bazooka (vert), Inscutable (rouge) et Pins (bleu). (C) Le domaine apical induit l'accumulation de facteurs tels que Numb, Brat, Prospero et Miranda (beige) au pôle opposé. Ils contrôlent également l'alignement du fuseau mitotique. (D) Après la division, les facteurs du pôle basal sont hérités uniquement par la cellule fille GMC.

Adapté de Knoblich, 2001

Ces protéines assurent la coordination des étapes finales nécessaires à l'asymétrie de la division : (1) d'une part en induisant la localisation au pôle basal des facteurs de détermination Numb, Brain tumor (Brat) et Prospero (Pros). En effet, la kinase DaPKC, en phosphorylant Numb et Miranda, une protéine adaptatrice liée à Pros et Brat, provoque leur exclusion du cortex apical et par conséquent leur accumulation au pôle basal (Haenfler et al., 2012 ; Atwood and Prehoda, 2009) (Fig.4C). (2) d'autre part en contrôlant l'orientation du fuseau mitotique afin qu'il s'aligne parallèlement au plan de l'épithélium sus-jacent. La liaison de Baz avec la protéine adaptatrice Inscutable (Insc) permet l'ancrage à la membrane d'un complexe composé de Partner of Inscutable (Pins), Gai et Mud, qui assure la liaison avec les microtubules astraux impliqués dans l'orientation du fuseau mitotique (Kraut et al., 1996 ; Izumi et al., 2006 ; Siller et al., 2006).

La coordination de ces deux processus assure que seule une des cellules fille hérite de Pros, Brat et Numb (Fig.4D). Une perturbation de cette ségrégation asymétrique aboutit à des défauts dans l'identité des cellules filles.

En effet, le facteur de transcription Pros est un facteur clé dans la détermination de la GMC. Peu après la division, l'entrée de Pros dans le noyau, suite à la dégradation de Miranda, est suffisante pour induire la sortie du cycle cellulaire et la mise en place de l'identité GMC. Ainsi une perte de l'ancrage de Pros à la membrane des neuroblastes provoque leur différenciation précoce en GMC (Shen et al., 1997). Inversement, la perte de fonction *pros* conduit à un défaut de différenciation des GMC, à une surproduction de cellules souches (Betschinger et al., 2006).

Le répresseur post-transcriptionnel Brat aurait quant à lui deux fonctions : d'une part il participe avec Miranda à la localisation asymétrique de Pros (Lee et al., 2006) et d'autre part il active l'expression de *pros* (Lee et al., 2006), la sortie du cycle cellulaire et l'activation de facteurs de différenciation dans la GMC (Lee et al., 2006 ; Betschinger et al., 2006).

La protéine Numb, un inhibiteur de l'activation de Notch (Guo et al., 1996), joue quant à elle un rôle primordial dans les neuroblastes larvaires de type II. Dans ce type cellulaire, la cellule souche donne naissance non pas à une GMC mais à un progéniteur neural intermédiaire (INP). Cette cellule se divise asymétriquement pour s'auto-amplifier tout en donnant naissance à des GMCs (Bowman et al. 2008). Or l'inhibition de la voie Notch dans les INP, assurée par Numb, est nécessaire à leur différenciation. Ainsi



la perte de fonction *numb* résulte dans l'activation ectopique de la voie Notch dans INP et à un défaut de leur différenciation (Bowman et al. 2008).

Pour conclure, la ségrégation asymétrique de facteurs de détermination lors de la division permet d'engendrer l'expression différentielle de facteurs de différenciation, conduisant à la génération de deux cellules filles d'identités différentes. Cependant il existe également des signaux de type intrinsèque qui agissent indépendamment de la division.

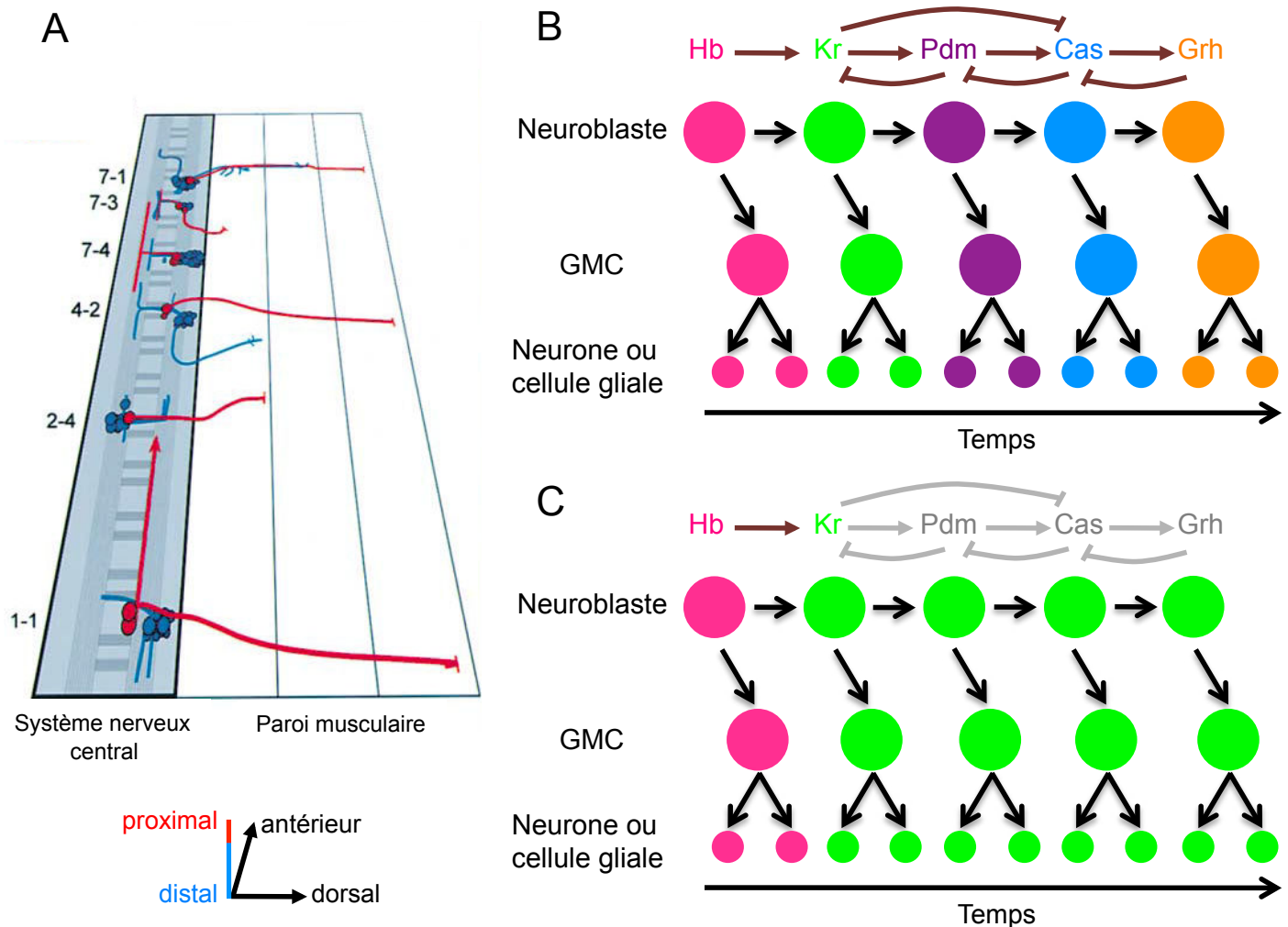
#### b. Facteurs temporels : formation du système nerveux central

Lors de la formation du cortex chez les vertébrés, les NSCs produisent séquentiellement les différents types de neurones. Or des NSCs cultivées individuellement *in vitro* sont capables de récapituler la séquence de production de neurones observée *in vivo* (Qian et al., 2000 ; Shen et al., 2006 ; Gaspard et al., 2008). Ainsi un même progéniteur neural est capable de changer sa potentialité et de générer des cellules d'identités différentes. Or, dans ces conditions de culture isolée, ce changement ne peut pas résulter d'un signal provenant des cellules adjacentes. Comment une même cellule, sortie de son contexte physiologique et de toute régulation par son environnement, peut-elle changer sa potentialité cellulaire au cours du temps ?

Un phénomène semblable est observé avec les neuroblastes d'embryon de drosophile. Chaque neuroblaste est à l'origine d'un lignage cellulaire particulier en accord avec sa position le long de la corde ventrale (Fig.5A et Fig.13A). Il produit chaque type de descendant dans un ordre très stéréotypé (Schmid et al., 1999). Ainsi le neuroblaste NB 7-1, formé précocement, donne naissance entre 16 et 22 neurones dont cinq motoneurones (U1-U5), un groupe d'interneurones et de cellules gliales (Schmid et al., 1999) alors que le NB 7-3 est à l'origine de la formation d'un motoneurone et trois interneurones (EW1-EW3).

Des études ont montré, qu'au fil de la production de ces différents types cellulaires, la plupart des neuroblastes expriment de manière séquentielle une série de facteurs de transcription : Hunchback (Hb), suivi de Kruppel (Kr), Pdm1 et Pdm2, Castor (Cas) puis Grainyhead (Grh) (Fig.5B) (Isshiki et al., 2001 ; Brody et Odenwald, 2000 ; revue par Maurange, 2012). Comme les NSCs de souris, les neuroblastes de drosophile cultivés *in vitro* récapitulent les lignages observés *in vivo*, notamment en maintenant la séquence de facteurs de transcription décrite ci-dessus (Brody et Odenwald, 2000). Comment





**Figure 5 : Acquisition de l'identité dépendante du temps dans les neuroblastes de l'embryon de drosophile**

(A) Schéma représentant le lignage de différents neuroblastes. Noter que chaque neuroblaste développe un lignage spécifique et les projections neuronales qui en résultent sont différentes. De Isshiki et al., 2001 (B) Schéma du réseau d'interaction permettant la transition temporelle de l'identité des neuroblastes. (C) Illustration de l'impact de la mutation d'un facteur de transcription temporel sur l'identité des neuroblastes. GMC, cellule mère ganglionnaire; Hb, Hunchback en rose; Kr, Kruppel en vert; Cas, Castor en violet; Pdm, POU domain protein en bleu; Grh, Grainyhead en orange.

cette séquence d'expression est-elle initiée ? Joue-t-elle un rôle dans le changement de potentialité des neuroblastes ?

Les neuroblastes effectuant des divisions asymétriques, il est possible d'envisager que ces changements de capacité sont la conséquence de la répartition différentielle de facteurs comme décrit dans la section précédente. Or l'inhibition de la division au début de l'expression de *Kr* ne modifie pas cette séquence d'expression (Grosskortenhaus et al., 2005), indiquant qu'un phénomène supplémentaire est en jeu. La modification d'identité des neuroblastes découle donc d'un mécanisme interne indépendant de la division cellulaire. La seule variable qui reste donc envisageable pour la modification d'identité des neuroblastes est le temps. Comment une variation temporelle peut-elle contrôler l'expression séquentielle de facteurs de transcription ?

Des études ont pu mettre en évidence que ces facteurs de transcription eux-mêmes sont à l'origine de cette cascade d'expression. Ils sont donc appelés Facteurs de Transcription Temporels (TTF). Par un jeu de régulations croisées, la progression temporelle permet cette séquence d'expression et la modification d'identité des neuroblastes. Dans ce système, le premier facteur (*Kr*) active l'expression du suivant (*Pdm*) mais réprime celle du troisième (*Cas*). A son tour, le deuxième facteur (*Pdm*) active l'expression du troisième (*Cas*) tout en réprimant celle du premier (*Kr*) et ainsi de suite (Fig.5B).

De ce fait, la perte ou le maintien de l'expression d'un seul de ces facteurs interrompt la cascade d'expression *Hb* -> *Kr* -> *Pdm* -> *Cas* -> *Grh*. Par exemple, lors de la perte de fonction du gène *pdm*, l'expression du gène *kr* n'est plus réprimée alors que en parallèle celle de *cas* n'est plus activée (Fig.5C). Les neuroblastes continueront donc d'exprimer *kr* et produiront les identités correspondantes à ce facteur (Tran et Doe, 2008). Ce jeu de régulations croisées est un système robuste, indépendant des divisions cellulaires, qui assure que le facteur initial soit rapidement éteint tout en évitant l'expression précoce des facteurs en aval de la cascade.

Toutefois, une des propriétés des TTFs est qu'ils ne sont pas à proprement parler des déterminants cellulaires. Ils ne conduisent pas à l'acquisition d'une identité particulière mais plutôt à une transition de l'identité engagée par le précédent TTF vers une nouvelle. Ainsi, le type cellulaire obtenu à la suite de l'expression d'un TTF ne sera pas le même en fonction de la localisation du neuroblaste dans la corde ventrale. Par exemple, l'expression de *hb* dans le lignage NB 7-1 correspond à la formation des deux



premiers motoneurones U1 et U2 alors que dans le lignage NB 7-3 cela conduit à la formation du premier interneurone EW1. De ce fait l'altération de l'expression de *hb* n'aura pas les mêmes conséquences sur le lignage. La perte de fonction induit une perte des cellules normalement Hb+ : les motoneurones U1 et U2 pour le NB 7-1 et l'interneurone EW1 pour le NB 7-3. Réciproquement, un gain de fonction *hb* induira la production de lignages composés uniquement de motoneurones de type U1/U2 pour le NB 7-1 et d'interneurones EW1 pour le NB 7-3 (Isshiki et al., 2001). En conclusion les TTFs ne sont pas des déterminants cellulaires à proprement parler mais ils contrôlent toutefois l'identité temporelle des neuroblastes.

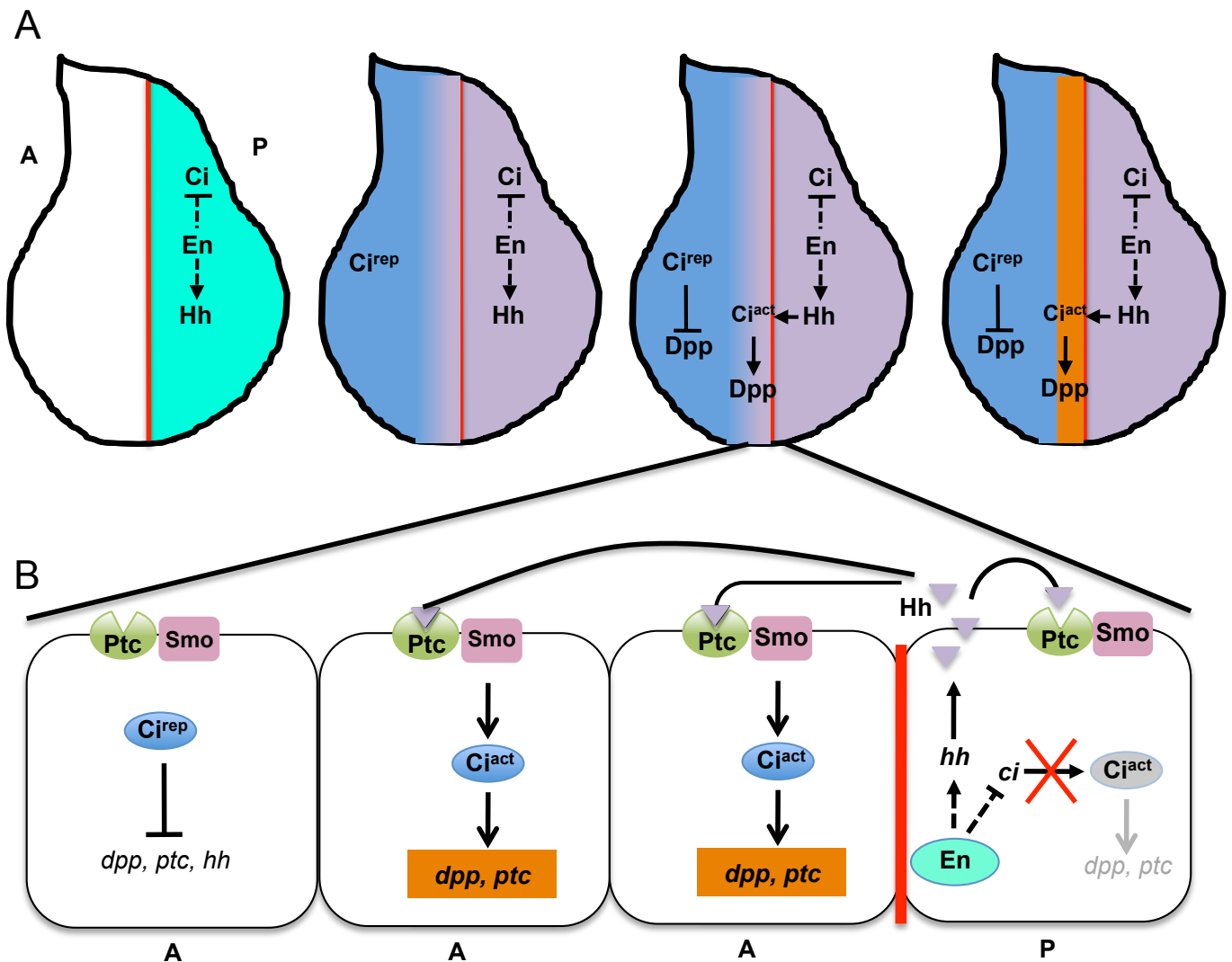
Pour résumer, la progression temporelle est un mécanisme de détermination intrinsèque. Elle permet l'expression séquentielle de facteurs de transcription via une boucle d'auto-régulation et un changement d'identité des cellules.

## (2) *Les signaux extrinsèques*

Le mécanisme de détermination extrinsèque concerne tous les signaux provenant de l'environnement et influençant la destinée d'une cellule. Il existe deux grandes familles de signaux extrinsèques : les signaux chimiques, correspondant à des molécules captées par les cellules grâce à des récepteurs spécifiques, mais également les signaux physiques, avec par exemple la tension mécanique appliquée sur une cellule/tissu ou les variations de température. Dans le cadre de la compréhension de mes travaux de thèse, je vais me concentrer principalement sur les signaux de type chimique, notamment les polypeptides sécrétés et transmembranaires. Ce type de détermination extrinsèque sera par la suite appelée communication cellulaire.

La communication cellulaire peut être découpée en deux phases : l'envoi d'un signal sous la forme de protéines sécrétées ou de ligands transmembranaires, et la réception de ce signal par une cellule compétente. La notion de compétence sous-entend d'une part que la cellule possède les récepteurs spécifiques au signal et qu'elle soit d'autre part capable de transduire et de répondre à cette activation.

Ainsi l'établissement de la communication cellulaire implique une coordination spatiale et temporelle entre le moment d'émission du signal et l'acquisition de la compétence par la cellule réceptrice.



**Figure 6 : Formation de l'axe antéro-postérieur dans le disque d'aile de drosophile**

(A-B) Illustration de la formation du compartiment antéro-postérieur dans le disque d'aile de drosophile. Un trait rouge représente la frontière. L'antérieur est à gauche et le postérieur à droite. (A) Disque d'aile entier. Cellules exprimant *engrailed* (En) en bleu clair et *decapentaplegic* en orange. La protéine Hedgehog (Hh) est en violet et Cubitus interruptus (Ci) en bleu foncé. (B) Grossissement des cellules adjacentes à la frontière. La protéine Hh est représentée par des triangles violets, son récepteur Patched (Ptc) en vert et la protéine adaptatrice Smoothen (Smo) en rose. Noter que la liaison de Hh à Ptc induit la transformation de Ci d'une forme répressive en une forme activatrice de l'expression des gènes *dpp* et *ptc*.

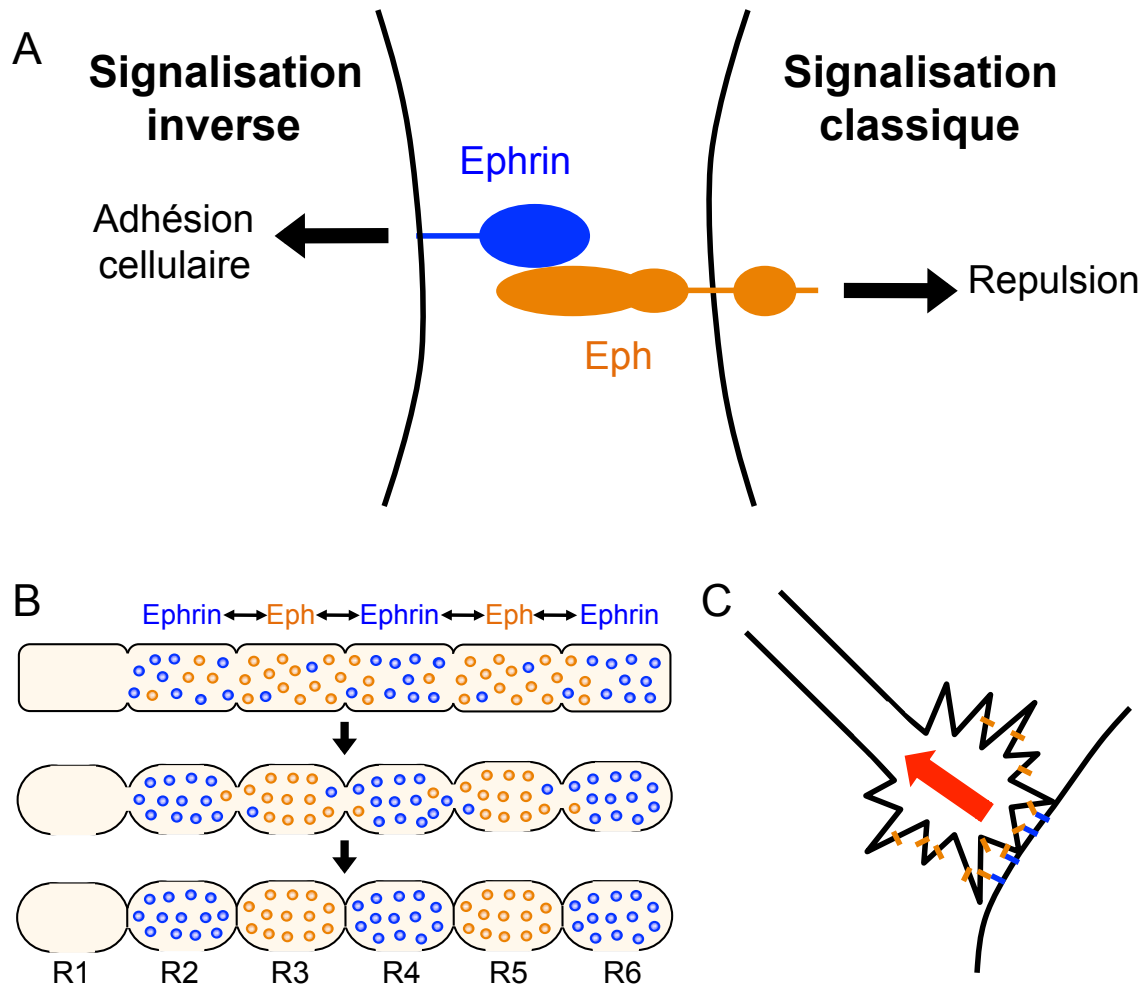
a. Morphogènes sécrétés : établissement du compartiment antérieur et du compartiment postérieur dans le disque d'aile de la drosophile

La formation de compartiments lors du développement est un exemple classique de communication cellulaire. Un compartiment correspond à une population de cellules au sein d'un organe qui ne se mélange pas avec les cellules adjacentes. Or les cellules de chaque compartiment communiquent entre elles, créant un centre organisateur à la frontière entre les différentes populations et prévenant un mélange entre les types cellulaires. L'établissement du compartiment antéro-postérieur des disques imaginaux de l'aile, de « petits sacs » de cellules précurseurs, dont dérivent l'aile et le thorax de la drosophile adulte (appelés disques d'aile) me servira d'exemple pour ce phénomène.

Au début des stades larvaires, les cellules composant le disque d'aile n'expriment pas toutes les mêmes facteurs. Le facteur de transcription *Engrailed* est uniquement exprimé par les cellules de la région postérieure (Klein, 2001). Dans ces cellules, *Engrailed* active d'une part la production de la molécule de signalisation *Hedgehog* (Hh) et réprime d'autre part l'expression du gène codant le facteur de transcription *Cubitus interruptus* (Ci) (Schwartz et al., 1995 ; Tabata et al., 1995). En absence d'*Engrailed*, les cellules de la région antérieure ne produisent pas Hh mais expriment le gène *ci* (Fig.6A).

Hh est une molécule sécrétée qui diffuse sur de courtes distances (soit dans cet exemple à la surface des cellules postérieures et quelques rangées de cellules de la région antérieure). Sa liaison avec son récepteur *Patched* (Ptc), présent au cortex de toutes les cellules du disque d'aile, bloque le clivage de Ci qui est alors transformé en activateur transcriptionnel (Revue par Jacob et Lum, 2009). Il est à noter qu'en absence de signal, Ci est présent sous une forme tronquée qui agit comme un répresseur transcriptionnel.

Les cellules postérieures présentent Ptc à leur surface. Cependant le facteur *Engrailed* inhibant la production de Ci, elles ne sont pas compétentes pour transduire ce signal. Ainsi l'expression des gènes cibles n'est pas activée dans la région postérieure. Les cellules antérieures les plus éloignées de la frontière, bien que produisant Ci et donc compétentes, ne reçoivent pas Hh. Le facteur Ci étant sous forme de répresseur, l'expression des gènes cibles dans ces cellules est réprimée. Par contre, les cellules antérieures proches de la frontière sont suffisamment proches de la source de Hh pour recevoir ce signal et y répondre en activant l'expression de gènes cibles tel que *decapentaplegic* (*dpp*) (Fig.6B ; Tabata et Kornberg, 1994).



**Figure 7 : La voie de signalisation Eph-Ephrin dans la formation des rhombomères et la croissance axonale**

(A) Représentation du signal Eph-Ephrin. Le récepteur Eph en orange et le ligand Ephrin en bleu. (B) Formation des rhombomères (R1-R6) du tronc cérébral. Noter que l'interaction entre Eph (orange) et Ephrin (bleu) conduit à la séparation des cellules en populations distinctes en fonction de la molécule présente à leur surface. Adapté de Trainor et Krumlauf, 2000 (C) L'interaction entre Eph et Ephrin lors de la croissance axonale conduit à l'émission d'un signal répulsif (flèche rouge).

Grâce à ce mécanisme, seules quelques rangées de cellules à la frontière antéro-postérieure expriment Dpp et forment ce que l'on appelle un centre organisateur. Cette zone contrôle la croissance et la morphogenèse de l'aile selon un axe antéro-postérieur (Ingham et Fietz, 1995 ; Guillén et al., 1995).

En plus de son rôle dans la formation du centre organisateur, Hh participe également au maintien de la frontière entre les compartiments en évitant que les cellules d'un compartiment se mélangent avec celles du compartiment voisin. En effet, l'exclusion réciproque des cellules de chaque compartiment résulterait d'une différence d'affinité entre elles (revue par Dahmann et Basler, 1999). Or l'activation du signal Hh modifierait l'affinité des cellules, les empêchant ainsi de se mélanger aux cellules ne recevant pas le signal ou non compétentes à le recevoir (Blair et Ralston, 1997).

Pour résumer, l'activation du signal Hh permet la formation d'un centre organisateur et la séparation des deux populations cellulaires par modification d'affinité. La limitation stricte de l'activation du signal à quelques rangées de cellules à la frontière des deux compartiments résulte d'une combinaison entre le lieu de production du signal et la localisation des cellules compétentes à sa transduction. Un même type de mécanisme, impliquant d'autres facteurs, est retrouvé lors de la mise en place de la frontière dorso-ventrale (voir introduction chapitre II.2.2).

#### b. Contact cellule - cellule : la voie de signalisation Eph-Ephrin

La voie de signalisation Eph-Ephrin contribue à la guidance axonale et la formation de compartiments dans le système nerveux. Elle agit sur de courtes distances par contact cellule-cellule.

La protéine Eph est un récepteur tyrosine kinase transmembranaire. Sa liaison avec le ligand Ephrin conduit à sa phosphorylation et au recrutement de facteurs initiant la transduction de la signalisation « classique ». Dans la cellule réceptrice, l'activation de Eph provoque un effet répulsif par rapport aux cellules positives pour Ephrin. Cependant des études montrent que la liaison du ligand Ephrin déclenche une signalisation inverse dans la cellule émettrice (Brückner et al., 1997 ; Davy et al., 1999), augmentant son adhésivité (Davy et al., 1999) (Fig.7A).

Chez les Vertébrés, cette voie de signalisation contribue à de nombreuses étapes du développement, notamment pour la formation du système nerveux central. Lors de la formation du tronc cérébral, la voie de signalisation Eph-Ephrin est requise pour la séparation des différentes populations de cellules en compartiments appelés





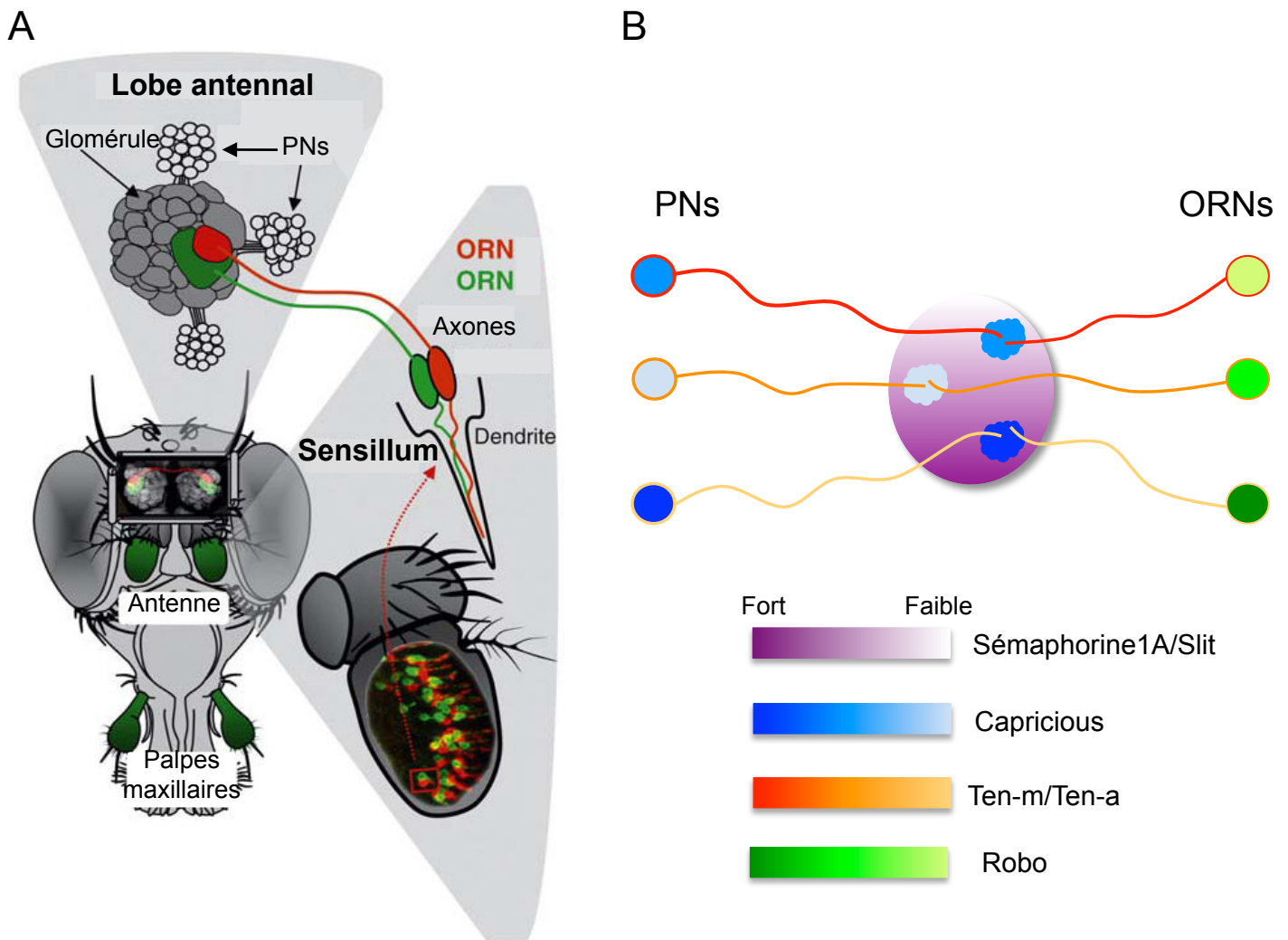
rhombomères (Xu et al., 2000). Un rhombomère ne sera constitué que de cellules positives pour Ephrin et le rhombomère adjacent ne comportera que des cellules positives pour Eph. Après cette réorganisation, les cellules adoptent des identités distinctes en fonction de leur compartiment (Trainor et Krumlauf, 2000). Ainsi indirectement la voie Eph-Ephrin participe à l'établissement de l'identité des cellules de chaque rhombomère (Fig.7B). Lors de la croissance des axones du système nerveux central, le récepteur Eph présent à la surface des axons provoque une redirection du cône de croissance quand il entre en contact avec des cellules positives pour Ephrin (Fig.7C). Ainsi cette voie définit le trajet des axones et participe à la différenciation du neurone (Henkemeyer et al., 1996 ; revue par Klein et Kania, 2014).

En résumé, la liaison de Eph à Ephrin est une voie de signalisation agissant par un mécanisme de contact entre cellules. L'activation du signal classique et du signal inverse contribue indirectement à la détermination et à la différenciation du système nerveux central des vertébrés.

### **3. De la détermination à la différenciation**

L'acquisition de l'identité est généralement suivie par la différenciation, autrement dit par la mise en place par la cellule des caractéristiques structurelles propres à l'identité concernée. Pour les neurones, ces caractéristiques consistent en des projections cytoplasmiques (neurites) orientées : les axones peu ramifiés qui s'étendent sur de longues distances et les dendrites hautement ramifiées qui se propagent localement. Les projections neuronales assurent la communication entre le système nerveux et les cellules musculaires. Le contrôle de la croissance de ces structures est essentiel pour assurer une connectivité optimale et une bonne coordination des fonctions nerveuses et musculaires. Dans ce chapitre je vais vous décrire brièvement comment se met en place la différenciation neuronale et plus particulièrement comment s'arborise le réseau axonal et dendritique.

Il est important de noter qu'en corrélation avec son identité, chaque type de neurone présente des projections axonales et dendritiques distinctes. Par exemple, les motoneurones de la drosophile issus des neuroblastes NB 7-1 et NB 7-3, bien que faisant parti du même type neuronal, ont une morphologie bien distincte (Schmid et al., 1999). Alors que les motoneurones du NB 7-1 ont de grandes projections innervant huit muscles dorsaux, ceux du NB 7-3 sont courts et innervent seulement un nombre plus réduit de muscles (trois). Comment la mise en place de l'arborisation individuelle des



**Figure 8 : Différenciation des neurones dans le système olfactif de la drosophile**

(A) Schéma du système olfactif de la drosophile. Le lobe antennal est le lieu de connexion des neurones sensibles aux odeurs (ORNs), provenant des organes sensoriels (sensillum) présents sur les palpes maxillaires et les antennes, avec les neurones intermédiaires (PNs) qui relayent l'information jusqu'au cerveau. Adapté de Brochtrup et Hummel, 2011 (B) Résumé des mécanismes contrôlant l'association spécifique des ORNs et des PNs. Les niveaux de Sémafhorine1A et de Slit guident respectivement les dendrites des PNs et les axones des ORNs vers une région spécifique du lobe antennal. Ensuite les dendrites des PNs, en fonction de leur niveau de Capricious, rejoignent un glomérule avec un niveau similaire. Finalement les ORNs, arrivant plus tard, établissent une connexion avec un PN présentant un niveau similaire de Teneurines (Ten-m/Ten-a)

neurones est-elle régulée ? Quels types de facteurs et de signaux sont en jeu ? Pour illustrer comment les facteurs de l'identité neuronale et l'environnement influencent la croissance des projections neuronales, je vais prendre comme exemple la formation du système olfactif de la drosophile, un réseau avec des connexions neuronales extrêmement précises et stéréotypées.

### (1) *Le système olfactif de la drosophile*

La drosophile perçoit les signaux olfactifs à partir de petites protrusions cuticulaires (sensillia) présentes à la surface des antennes et des palpes maxillaires (Fig.8A). Ces structures sont sensibles aux molécules chimiques grâce aux neurones les innervant qui possèdent à leur surface des récepteurs d'odeur. Lorsque ces neurones sont stimulés, l'influx nerveux est relayé au cerveau en passant par des neurones intermédiaires (PNs ou LNs).

La connexion entre les neurones sensibles aux signaux olfactifs (ORNs) et les interneurones (PNs) s'établit au niveau des glomérules du lobe antennal (équivalent du bulbe olfactif des vertébrés) (Fig.8A). De manière intéressante, un ORN établira toujours une connexion avec le même PN dans un glomérule bien spécifique du lobe antennal (Revue par Brochtrup et Hummel, 2011). Comment la croissance des neurites des ORN et PN est-elle régulée pour établir cette connexion unique?

Deux types de signaux sont impliqués : des signaux intrinsèques et des signaux extrinsèques. Les signaux extrinsèques correspondent à des ligands sécrétés qui agissent comme molécule attractive ou répulsive (Yu et Bargmann, 2001). Ils « guident » la projection neuronale jusqu'à sa cible. Quant aux signaux intrinsèques, ils contrôlent entre autre la compétence des neurones à percevoir ces facteurs. En effet ils activent la production du récepteur pour ce ligand et sa localisation à l'extrémité de l'axone.

En réponse à ces signaux, le neurone remodèle le cytosquelette présent dans ces projections, permettant un rapprochement ou un éloignement de la source du signal. Dans cette partie nous allons voir quelques exemples de facteurs impliqués dans la guidance des PNs et ORNs (Résumé en Fig.8B).

### (2) *Guidance de la dendrite des PNs*

La guidance extrinsèque des dendrites des PNs requiert une combinaison de nombreux facteurs. La Sémaphorine 1A est un ligand transmembranaire exprimée en gradient dans le lobe antennal. Ce facteur permet de guider la répartition dorso-latérale



et ventro-médiale des PN dans le lobe olfactif (Komiyama et al., 2007). En effet, en fonction du type de PN, la dendrite se développe vers des régions avec une concentration plus ou moins forte de Sémaphorine 1A (Fig.8B, violet). Toutefois, plusieurs glomérules ayant la même concentration de Sémaphorine 1A, ce gradient seul n'explique pas pourquoi un PN rejoint un glomérule spécifique au sein du lobe antennal.

La protéine transmembranaire Capricious (Caps) est présente de manière disparate dans le lobe antennal. De manière intéressante elle est aussi exprimée par quelques PN. Cette expression différentielle permettrait un adressage spécifique des PN (Hong et al., 2009). En effet, un PN exprimant Caps irait toujours dans un glomérule Caps positif et inversement (Fig.8B, bleu). Ainsi, la combinaison du gradient de Sémaphorine 1A et des « îlots » de Caps dans le lobe olfactif contribueraient, avec d'autres facteurs attracteurs ou répulsifs, à l'adressage spécifique des PN dans le lobe antennal.

Cependant, même si le lobe antennal exprime correctement les différents signaux de guidance, chaque neurone doit être pourvu des récepteurs adéquats pour diriger son axone vers sa cible. L'expression de ces molécules de surface est à son tour régulée par un programme transcriptionnel intrinsèque au neurone. Autrement dit, le neurone exprime une batterie spécifique de facteurs de transcription qui régule ainsi indirectement la guidance des axones au niveau global ou local. Par exemple, dans les PN, le facteur de transcription Cut contrôle la trajectoire globale des axones jusqu'au lobe antennal alors que le facteur Drifter agit de manière plus localisée en régulant l'adressage spécifique du PN au glomérule (Komiyama et Luo, 2007).

Pour résumer, facteurs intrinsèques et extrinsèques agissent de concert pour coordonner l'adressage spécifique des projections neuronales de PN.

### (3) *Guidance de l'axone des ORNs*

Les axones des ORNs parviennent après les dendrites des PN dans le lobe antennal. La guidance des axones des ORNs vers un PN spécifique fait également intervenir des facteurs d'attraction et de répulsions.

Parmi ces facteurs, les récepteurs Roundabout (Robo), Robo2 et Robo3, ainsi que leur ligand Slit permettent un adressage de l'axone vers un glomérule spécifique (Fig.8B, violet et vert). Les axones des ORNs ne présentent pas à leur surface la même combinaison de récepteurs. Une population exprime Robo seul alors que l'autre exprime Robo et Robo3. Cette différence d'expression conduit à une séparation des deux



populations après leur entrée dans le lobe antennal (Jhavery et al., 2003). Cette différence de combinaison de récepteur intervient également lors de l'adressage des axones des ORNs vers un glomérule spécifique (Jhavery et al., 2003).

De manière similaire au développement des PNs, l'expression de ces récepteurs dans les ORNs est intrinsèquement contrôlée par des facteurs de transcription tel que *Abnormal chemosensory jump 6* (*Acj6*) ou *Pdm3*. Une altération de l'expression de ces facteurs de transcription dans les ORNs conduit à des défauts de localisation de leur axones dans le lobe antennal (Komiyama et al., 2004 ; Tichy et al., 2008).

#### (4) *Connexion des ORNs et des PNs*

Nous venons de voir que la trajectoire des dendrites des PNs et des axones des ORNs au sein du lobe antennal est finement contrôlée et leur permet de cibler un glomérule spécifique. Un niveau supplémentaire de spécification s'ajoute lors de la connexion entre ORNs et PNs. En effet ceux-ci s'apparient en fonction de leur concentration membranaire de Teneurines (*Ten-m* et *Ten-a*). Un ORN avec un fort niveau de *Ten-m*/*Ten-a* rejoindra toujours un PN avec une forte expression de *Ten-m*/*Ten-a* et inversement (Fig.8B, rouge et orange). Une modification de ces niveaux d'expression bouleverse totalement l'appariement des ORN et PN (Hong et al., 2012).

Pour résumer, les facteurs intrinsèques, tels que les facteurs de transcription, contrôlent l'expression de récepteurs impliqués dans la guidance des axones. L'expression de ces facteurs étant différente dans chaque neurone, cela crée « un code moléculaire » unique et donc une réponse spécifique aux signaux de guidance. Ce modèle permettrait d'expliquer la grande diversité observée dans l'arborisation des projections neuronales.

## **II. La voie de signalisation Notch**

La voie de signalisation Notch est un mécanisme de communication cellulaire agissant sur de courtes distances et hautement conservée au sein des métazoaires. Elle repose sur la liaison entre un récepteur et un ligand transmembranaires présents à la surface de deux cellules adjacentes. L'activation du récepteur Notch provoque le clivage de sa région intracellulaire. Cette dernière va directement contrôler l'expression des





gènes cibles, notamment celle de facteurs intervenants dans la régulation de l'apoptose, de la prolifération et de la détermination cellulaires.

Les premières mutations affectant cette voie ont été isolées chez la drosophile il y a presque 100 ans. Cette étude a montré que la perte de fonction partielle d'un gène, identifié par la suite comme codant le récepteur transmembranaire Notch, induit un phénotype « d'aile à encoche » (notched wing). Depuis, ce récepteur et son mode d'action ont été attentivement étudiés, permettant de mettre à jour son importance cruciale dans le développement et dans la formation de pathologies telle que le cancer.

Lors de ma thèse, mes travaux m'ont conduit à analyser les mécanismes ainsi que les facteurs intervenants dans la régulation de cette voie de signalisation. Je vais consacrer ce chapitre à la description de la voie de signalisation Notch et ainsi des mécanismes et des facteurs impliqués dans sa régulation.

## **1. L'émission et la transduction du signal Notch**

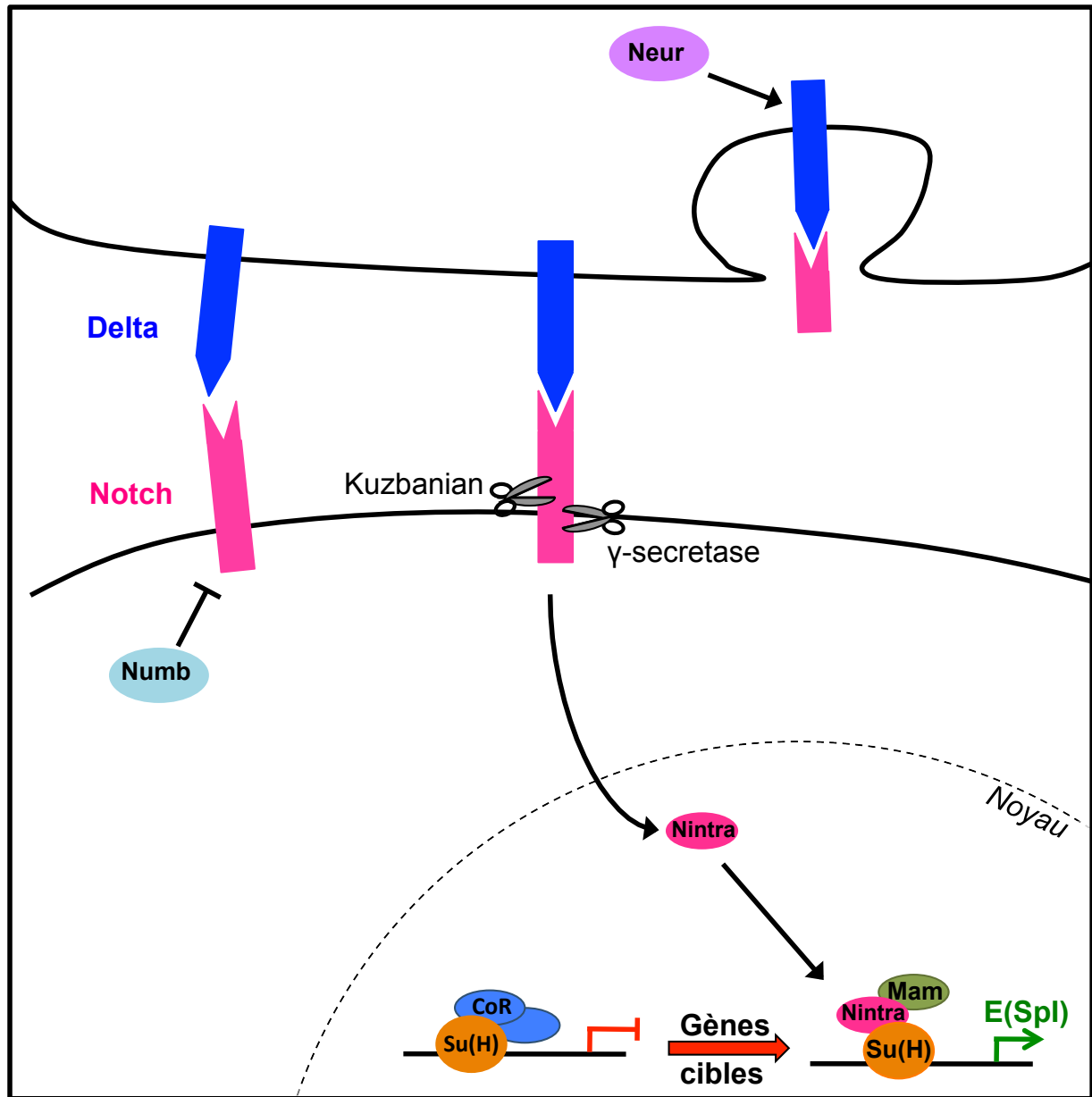
### *(1) Caractéristiques du récepteur Notch*

La protéine Notch est composée de : (1) une large région extracellulaire (Necd) contenant des répétitions de type Epidermal Growth Factor (EGF) et des répétitions riches en cystéines (LNR) et (2) une partie intracellulaire (Nintra) contenant six régions ankyrine impliquées dans le contact protéine-protéine, un domaine riche en glutamines et une séquence PEST.

Chez les mammifères, lors de la maturation dans l'appareil de Golgi, le récepteur Notch est clivé par une protéase de type Furin (clivage S1). Ce clivage induit une séparation de la partie extracellulaire et intracellulaire. Notch sera donc présent à la membrane sous la forme d'un hétérodimère lié de manière non-covalente (Logeat et al., 1998). Toutefois l'implication de ce clivage sur la fonction du récepteur n'est pas essentielle pour tous les orthologues de Notch (Gordon et al., 2009). De même, chez la drosophile, bien que ce clivage existe, il semble être peu effectif vu que la majorité des récepteurs présents à la membrane ne sont pas sous forme d'hétérodimères (Kidd et Lieber, 2002).

### *(2) La liaison de Notch à ses ligands DSL*

La liaison du récepteur Notch avec ses ligands transmembranaires DSL (Delta et Serrate chez la drosophile, Delta et Jagged chez les Vertébrés, LAG-2 et APX-1 chez C.



**Figure 9 : La voie de signalisation Notch**

Schéma illustrant la voie Notch. La liaison du récepteur Notch (rose) et le ligand Delta (bleu) induit le clivage S2 (induit par Kuzbanian) et S3 (induit pas la  $\gamma$ -secretase) du récepteur Notch. La région intracellulaire de Notch (Nintra) est libérée. Nintra rejoint le noyau où elle transforme le complexe répresseur en complexe activateur, activant l'expression des gènes cibles de la voie. Numb (bleu clair) provoque l'exclusion du récepteur Notch de la membrane plasmique. Neuralized (Neur, en violet) favorise l'endocytose du ligand Delta, un processus essentiel à la liaison Notch/Delta.

*elegans*) présents à la surface des cellules voisines induit deux clivages successifs du récepteur.

Le premier clivage (S2), effectué dans la partie extracellulaire du récepteur, est catalysé par une métalloprotease de la famille ADAM (Kuzbanian chez la drosophile). Ce clivage et surtout le raccourcissement de la partie extracellulaire qui en découle, est essentiel à l'initiation du second clivage intramembranaire (S3) (Mumm et al., 2000).

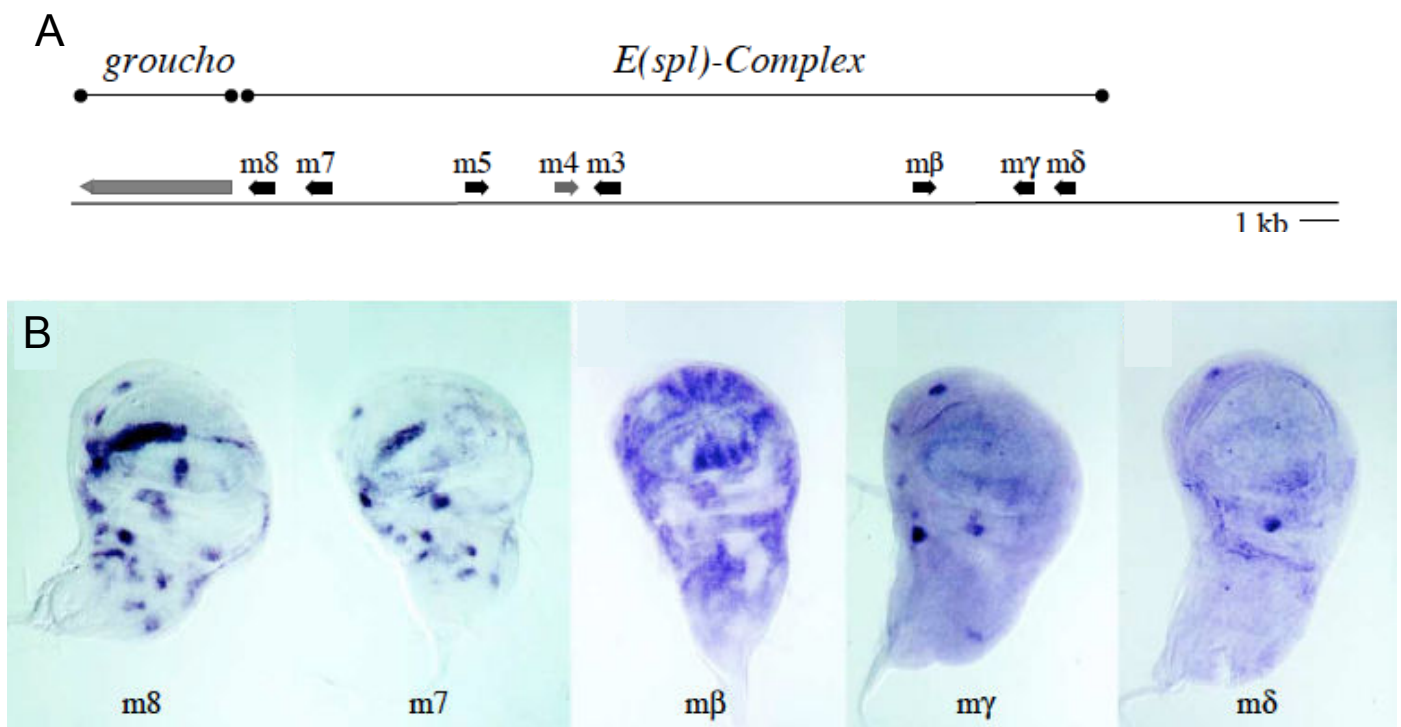
Le clivage intramembranaire S3, catalysé par le complexe  $\gamma$ -secretase (composé des facteurs presenilin, nicastrin, PEN2 et APH1), induit la libération de la partie intracellulaire du récepteur (N<sub>intra</sub>) (Revue par Fortini, 2002). Après sa libération, N<sub>intra</sub> est directement transloqué dans le noyau (Fig.9).

### (3) *La transduction du signal Notch*

Les protéines de liaison à l'ADN regroupées sous le terme CSL (CBF1 chez les mammifères, Su(H) chez la drosophile et LAG-1 chez le nématode) sont essentielles pour la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes cibles de la voie Notch.

En absence d'activation du signal Notch, les protéines CSL interagissent avec les facteurs Hairless, Groucho et C-Terminal Binding Protein (CtBP). Cette interaction forme ce que je désignerai par la suite comme le complexe répresseur qui inhibe l'expression des gènes situés en aval en recrutant des histones déacéthylases (Castro et al., 2005 ; Barolo et al., 2002 ; revue par Bray et Bernard, 2010). Lorsque la voie Notch est activée, N<sub>intra</sub> se lie à son co-activateur Mastermind (Mam). Ces deux facteurs interagissent avec les protéines CSL, formant le complexe activateur. Ce complexe va alors activer l'expression des gènes qui étaient auparavant inhibés par le complexe répresseur.

Les protéines CSL ont donc un rôle pivot dans la transduction du signal Notch, participant aussi bien à l'activation qu'à la répression des gènes cibles de Notch. Quels sont ces gènes cibles ? Comment la bivalence des protéines CSL a-t-elle été mise en évidence ? Comment le complexe répresseur est-il transformé en complexe activateur après activation de la voie Notch ? Voici quelques questions essentielles à la compréhension de la voie Notch aux lesquels je vais essayer de répondre en présentant les principaux travaux sur le sujet et les différentes hypothèses actuellement en cours.



**Figure 10 : Variation de l'expression des gènes du locus *enhancer of split* dans le disque d'aile de drosophile**

(A) Le locus *Enhancer of split* (*E(spl)*) chez la drosophile. La ligne représente l'ADN génomique. Les flèches représentent les transcrits. (B) Expressions des gènes *E(spl)m8*, *E(spl)m7*, *E(spl)mβ*, *E(spl)mγ* et *E(spl)mδ* dans le disque d'aile de drosophile, détectées par hybridation *in situ*.

Schéma et photographies extraits de de Celis et al., 1996.

a. Les gènes cibles de la voie Notch : une expression contexte-dépendante

L'identification des gènes cibles de la voie Notch pourrait sembler simple et consister en une analyse des promoteurs sur lesquels les protéines CSL se fixent. Mais la réponse des gènes à l'activation de la voie est loin d'être aussi binaire. Certes la réponse des gènes à l'activation de la voie Notch dépend de la fixation des protéines mais aussi du type cellulaire et de la présence d'autres facteurs.

Parmi les gènes cibles de Notch, les mieux caractérisés restent les gènes du locus *Enhancer of split (E(spl))* chez la drosophile (Fig.10A), orthologues de la famille HES/HEY des vertébrés) codant des facteurs de transcription basiques de type hélice-boucle-hélice (bHLH). Bien que l'expression de ces sept gènes (*m8*, *m7*, *m5*, *m3*, *mβ*, *mγ* et *mδ*) soit régulée par Notch, ils ont des patrons d'expression différents (Fig.10B). Les gènes *m8*, *m7*, *mγ*, *mδ* et *m3* sont exprimés dans les futurs organes sensoriels du disque d'aile de drosophile (de Celis et al., 1996b). Cependant *m8* et *mγ* sont les seuls de ces 5 gènes à être également exprimés dans les cellules à la frontière du compartiment dorsal et du compartiment ventral. Le gène *mβ* est exprimé dans quasiment tout le disque d'aile avec toutefois une expression plus marquée au niveau de la frontière dorso-ventrale et des stries correspondant aux futures veines (la frontière dorso-ventrale et la formation des veines sont deux processus régulés en partie par la voie Notch). Finalement l'expression du gène *m5* n'est pas détectée dans le disque d'aile (de Celis et al., 1996b). Bien que ces sept gènes soient tous des cibles de la voie Notch, leur différence de profil d'expression suggère que l'expression des gènes du locus *E(spl)* est régulée différemment pour chaque gène. De plus, cette différence dépendrait du type cellulaire et donc des autres facteurs présents.

Le qualificatif de « gène cible de la voie Notch » doit donc être décerné uniquement en considérant les types cellulaires. Un autre exemple est le gène codant le facteur de transcription *cut* chez la drosophile. Dans le disque d'aile, son expression est induite lors de l'activation de Notch à la frontière dorso-ventrale (Miccheli et al., 1997), indiquant que dans ce contexte *cut* est une cible de la voie Notch. *A contrario*, dans le lignage des soies sensorielles, où Notch est activé de manière différentielle à chaque division, il est exprimé de manière constante dans toutes les cellules du lignage (Simon et al., 2009), montrant qu'ici son expression n'est pas contrôlée par Notch. Ainsi *cut* est un gène cible



de Notch dans le contexte de la formation de la frontière dorso-ventrale mais pas dans le lignage des soies.

Lors des analyses visant à comprendre la fonction de Notch, de nombreux autres gènes cibles ont été mis à jour. Parmi eux on trouve notamment des régulateurs du cycle cellulaire (Cycline D, Cdc25, Myc, p21), de la mort cellulaire (Reaper, Hid) et des composants d'autres voies de signalisation (MAP kinase, EGFR) (Revue par Bray et Bernard, 2010). Mais la réponse de ces gènes à l'activation du signal Notch sera dépendante des autres facteurs présents. Ainsi la voie Notch peut promouvoir l'activation d'une voie dans une cellule et réprimer cette même voie dans une cellule voisine mais d'un type cellulaire différent (Krejci et al., 2009).

Pour conclure, définir un gène comme une cible de Notch est une question complexe et dépendante du type cellulaire concerné. La réponse transcriptionnelle d'un gène sera conditionnée par d'autres facteurs et pas uniquement par Notch. Comment ces facteurs influencent-ils la réponse transcriptionnelle à la voie Notch ? Nous traiterons ce point plus loin et je vous présenterai les différentes hypothèses en cours.

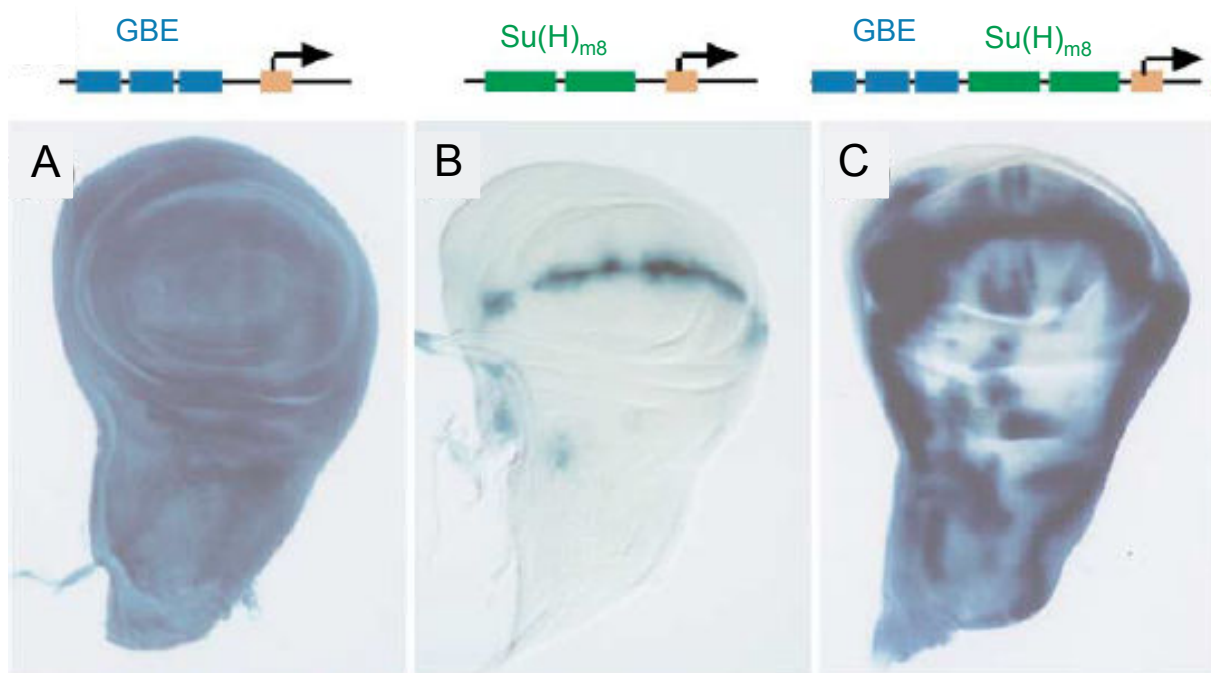
#### b. Mise en évidence de la bivalence des protéines CSL.

La relation entre les protéines CSL et la voie Notch a été mise en évidence par le fait que les phénotypes observés lors de la perte de fonction du gène *Suppressor of hairless* (*Su(H)*, la protéine CSL chez la drosophile) sont très similaires à ceux dans des mutants *Notch*. En effet dans les disques d'aile, la perte de fonction *Su(H)*, tout comme celle de *Notch*, induit une augmentation du nombre d'organes sensoriels (Schweisguth et Posakony, 1992).

L'étude des fonctions de *Su(H)* par des méthodes moléculaires et génétiques a mis en évidence que *Su(H)* se fixe sur l'ADN des promoteurs des gènes cibles de la voie Notch, notamment ceux du locus *E(spl)*, et qu'il contribue à activer leur expression lorsque la voie Notch est active (Lecourtois et Schweisguth, 1995 ; Bailey et Posakony, 1995). De plus, ces études ont commencé à dépeindre la bivalence de *Su(H)*, autrement dit son action activatrice ou répressive en fonction des partenaires auquel il est associé (*N<sub>intra</sub>* ou *Hairless*) (Lecourtois et Schweisguth, 1995 ; Bailey et Posakony, 1995).

Néanmoins, cette bivalence de *Su(H)* n'a été clairement mise en évidence que plus récemment, notamment avec l'étude de différentes lignées transgéniques comportant des rapporteurs d'expression de gènes. Une de ces lignées comporte une construction





**Figure 11 : La protéine Su(H), activateur et répresseur de l'expression des gènes**

Expression dans le disque d'aile des rapporteurs comportant des sites de fixation pour Grainyhead GBE (A), des sites de fixation pour Su(H) provenant du gène *E(spl)m8* Su(H)<sub>m8</sub> (B) et GBE + Su(H)<sub>m8</sub> (C) en amont de la séquence codant la  $\beta$ -Galactosidase.

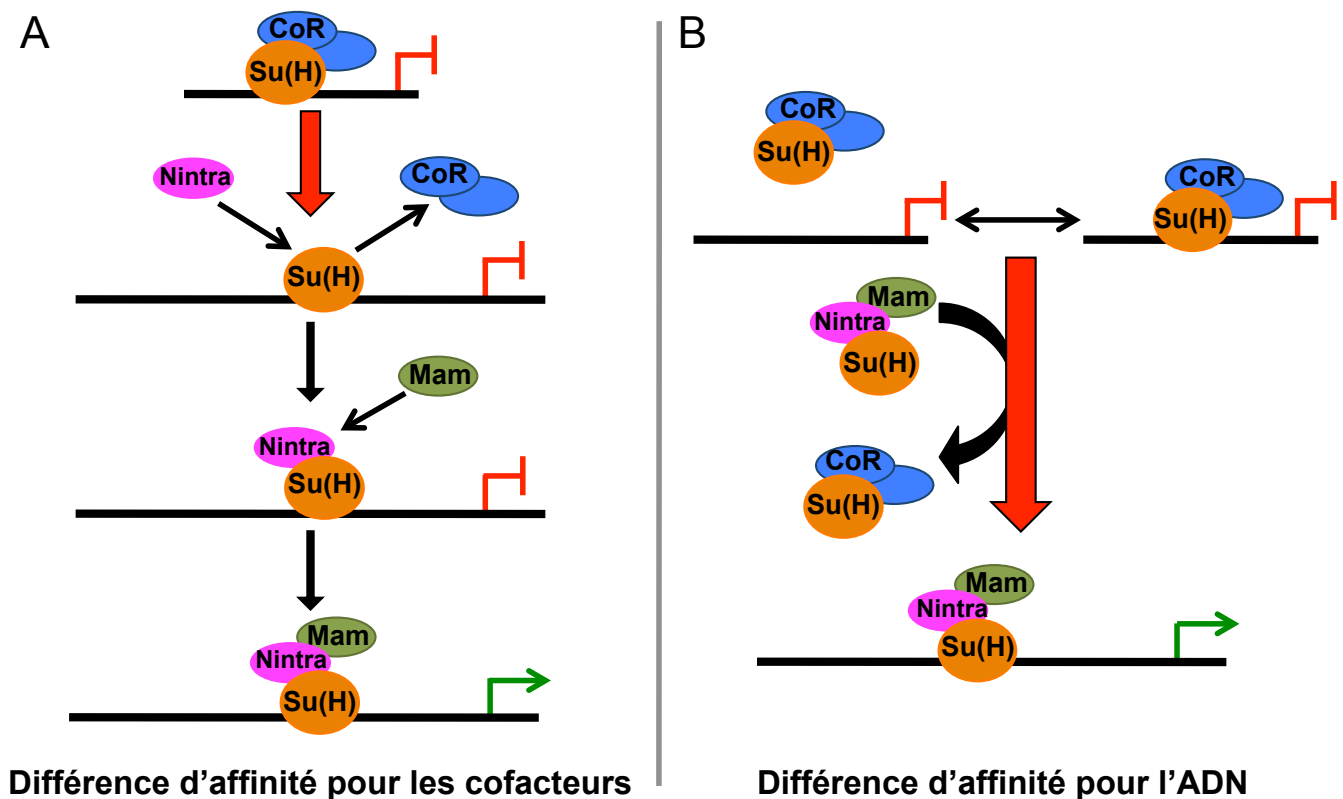
Photographies extraites de Furriols et Bray, 2001

contenant un promoteur composé uniquement de sites de fixation pour le facteur de transcription Grainyhead (Grh) en amont d'un gène rapporteur lacZ. Dans des larves de troisième stade, l'expression de ce rapporteur est détectée de manière homogène dans tout le disque d'aile (Fig.11A).

De manière intéressante, l'ajout au promoteur de cette construction de séquences correspondant aux sites de fixation pour Su(H) provenant du gène *enhancer of split m8* (Su(H)<sub>m8</sub>) provoque une modification de l'expression du gène rapporteur. D'une part, le rapporteur est exprimé dans les cellules où la voie Notch est activée (frontière dorso-ventrale, organes sensoriels et tissu interveineux) et cette expression est plus forte qu'avec la construction précédente (Fig.11C). D'autre part, dans les cellules où la voie Notch n'est pas activée, le rapporteur n'est pas exprimé alors qu'il était exprimé dans toutes les cellules du disque d'aile avec la construction comportant uniquement des sites de fixation pour Grh (Fig.11C à comparer avec Fig.11A). Ensemble, ces observations montrent que l'ajout de sites de fixation pour Su(H) va activer l'expression des gènes dans les cellules où la voie Notch est active. A l'inverse il va les réprimer dans les cellules où elle n'est pas active (Furriols et Bray, 2001). La fixation de la protéine Su(H) sur l'ADN est donc essentielle pour allumer ou éteindre l'expression en fonction de l'activité de la voie Notch et ces expériences ont permis de visualiser clairement la bivalence de Su(H). De plus, je tiens à souligner que la construction comportant les sites de fixation pour Grh et Su(H)<sub>m8</sub> est depuis fréquemment utilisée comme un rapporteur minimal de l'activité Notch (Schneider et al., 2013 ; Zacharioudaki et Bray, 2014).

Par ailleurs, il est à noter qu'un promoteur composé uniquement de sites Su(H)<sub>m8</sub> n'induit que faiblement et de manière disparate l'expression du gène rapporteur LacZ (Fig.11B). Or normalement, en réponse à l'activation de Notch, le gène *m8* est fortement exprimé dans tous les futurs organes sensoriels (De Celis et al., 1996b). Ces données indiquent que la fixation de Su(H) en amont des gènes n'est pas suffisante pour activer pleinement leur expression, même dans les cellules où la voie Notch est active. Ainsi la présence d'autres facteurs, comme par exemple Grainyhead, est requise pour potentialiser l'expression des gènes activés par le signal Notch (mais nous reviendrons sur ce point plus tard).

Pour résumer, Su(H) est un facteur bivalent et son activité dépend des facteurs avec lesquels il est associé. Ce facteur est un élément central de la voie Notch et pour la



**Figure 12 : Modèles pour la conversion du complexe répresseur en complexe activateur**

Modélisation des hypothèses sur le mécanisme moléculaire permettant la transformation du complexe répresseur en complexe activateur suite à l'activation de la voie Notch. Su(H) en orange, Nintra en rose, Mastermind en vert et les co-répresseurs CtBP, Hairless et Groucho en bleu (A) La transition de complexe répresseur à complexe activateur est due à une différence d'affinité de Su(H) pour ses cofacteurs. Dans ce modèle, la fixation de Su(H) sur l'ADN est constante. Lorsque le récepteur Notch n'est pas activé, Su(H) interagit avec les co-répresseurs et les gènes cibles sont réprimés. Quand la voie Notch est active, Nintra et Mam, ayant une plus forte affinité avec Su(H), remplacent les co-répresseurs et activent l'expression des gènes cibles. (B) La transition de complexe répresseur à complexe activateur est due à une différence de leur affinité pour l'ADN. Dans ce modèle, Su(H) est toujours présent sous forme de complexe. Le complexe répresseur a peu d'affinité avec l'ADN. Il est donc fixé sur l'ADN de manière transitoire (haut). Le complexe activateur, formé lors de l'activation du récepteur Notch, a une plus forte affinité pour l'ADN et sa fixation est plus stable (bas).

Adapté d'après Bray et Bernard, 2010

régulation de l'expression des gènes cibles de la voie. Mais je tiens tout de même à mettre un petit bémol ici : ceci concerne la voie Notch canonique. Ils existe effectivement des exemples où la voie Notch est activée selon un mécanisme indépendant de Su(H) (Lecourtois et Schweisguth, 1995 ; Nagel et al., 2000 ; revue par Andersen et al., 2012). On parle alors de la voie Notch non canonique.

### c. La transformation du complexe répresseur en complexe activateur

Comme nous venons de le voir, Su(H) activera ou réprimera l'expression des gènes en fonction des partenaires avec lesquels il interagit. L'interaction de Su(H) avec Hairless, CtBP et Groucho forme le complexe répresseur. Associé avec Nttra et Mastermind (Mam), il forme le complexe activateur. Comment la protéine Su(H) change-t-elle de partenaires ? Comment la transition entre le complexe répresseur et le complexe activateur est-elle effectuée ?

Dans le modèle classique, Su(H) est fixé de manière statique sur l'ADN (Fig.12A). En absence de signal Notch, Su(H) interagit avec ses partenaires répresseurs, inhibant ainsi l'expression des gènes. Lorsque le récepteur Notch est activé, Nttra associé à Mam interagirait avec Su(H), induisant un changement conformationnel de Su(H). La modification de la structure de Su(H) diminuerait son affinité pour ses partenaires répresseurs, provoquant leur libération puis leur remplacement par Nttra et Mam (Maier et al., 2006 ; Wilson et Kovall, 2006).

Cependant, des études récentes remettent en cause cette vision statique de Su(H) sur l'ADN. Dans ce modèle, Su(H) est plutôt vu comme faisant parti des complexes activateurs et répresseurs et non pas comme une entité propre (Fig.12B). Ainsi Su(H) ne changerait pas de partenaires lorsque la voie Notch est activée. C'est tout le complexe répresseur qui serait remplacé. Un argument pour appuyer ces différents points est, qu'en absence d'activation de la voie Notch, la quantité de chromatine immunoprécipitée par Su(H) est plus faible comparée à celle obtenue lorsque la voie est activée (Krejci et Bray, 2007 ), indiquant que Su(H) ne serait pas fixé en permanence à l'ADN et que la stabilité de sa fixation dépendrait de l'état de la cellule par rapport à Notch. De ces observations, les auteurs proposent un modèle où le complexe répresseur aurait une affinité faible pour l'ADN, conduisant ce complexe à n'être fixé que de manière transitoire. A l'inverse, le complexe activateur aurait une affinité plus forte pour l'ADN et sa fixation serait donc plus stable. Ainsi lorsque la voie Notch est activée, le



complexe activateur remplacerait le complexe répresseur en aval des gènes cibles de Notch et activerait leur expression (Krejci et Bray, 2007 ; Friedmann et Kovall, 2011).

## **2. Notch au cours du développement**

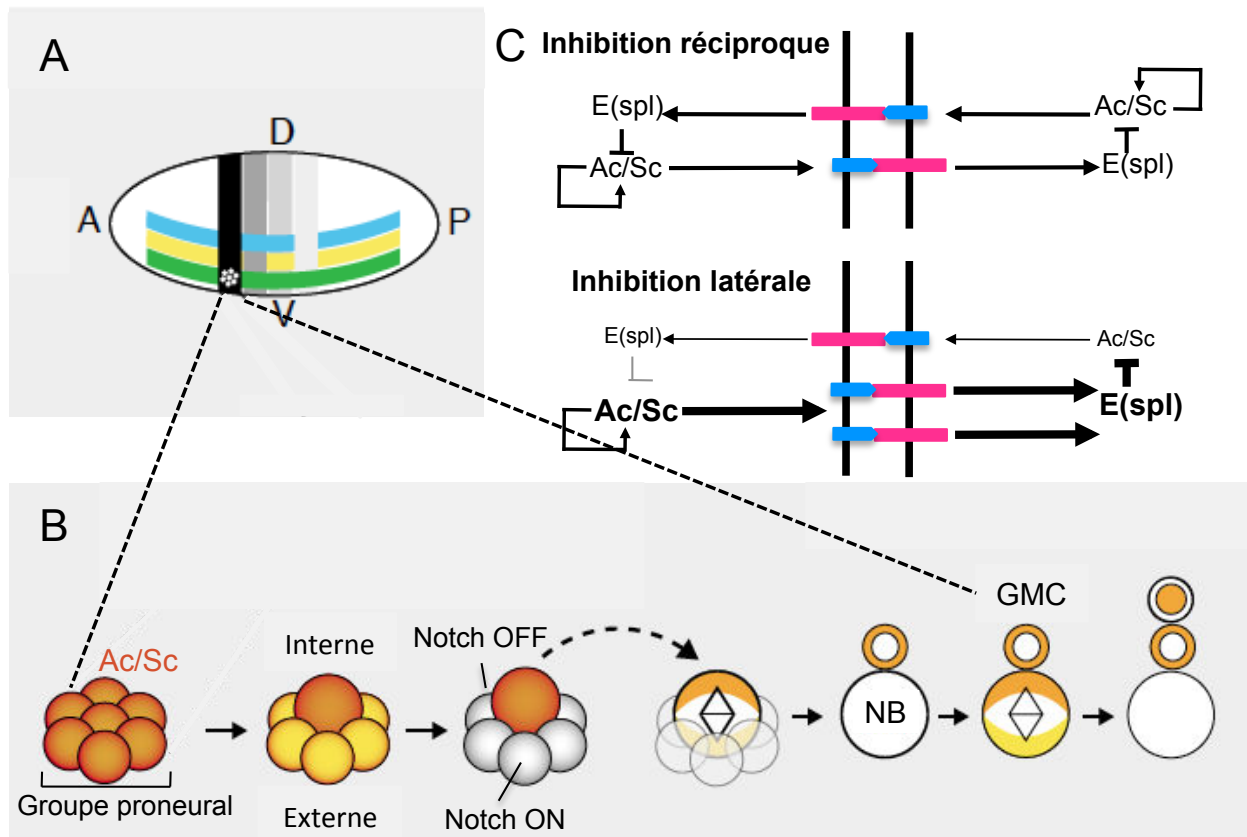
La voie de signalisation Notch est utilisée itérativement tout au long du développement et contrôle aussi bien la prolifération, la mort cellulaire et l'identité des cellules. Tout défaut dans l'activation de cette voie conduit à une altération de l'homéostasie tissulaire. Même si Notch contrôle la prolifération et la mort cellulaire, ces effets varient énormément en fonction du contexte cellulaire. Néanmoins, lors des analyses fonctionnelle de Notch, un seul effet est constamment observé : Notch régule l'acquisition de l'identité cellulaire dans des cellules non différenciées.

Afin d'illustrer ce point, dans cette partie je vais vous présenter quelques exemples de processus développementaux où la voie Notch régule l'identité cellulaire dans des tissus en cours de développement. Cette partie me permettra également d'introduire les mécanismes régulant l'émission et la transduction du signal Notch, un sujet que je traiterai plus en détail dans la section suivante.

### **(1) *Le système nerveux***

Si une diminution de l'activité Notch induit des phénotypes d'encoches dans l'aile, la perte de fonction totale est létale au stade embryonnaire. Les embryons homozygotes mutants *Notch* présentent des phénotypes dits neurogéniques, c'est à dire une augmentation du nombre de cellules neurales au détriment des cellules épithéliales (Poulson, 1937). De même, lors d'une perte de fonction de Notch tardive (grâce à un système inductible), le nombre d'organes sensoriels disséminés sur le thorax de l'adulte augmente. Comment la perte de fonction de Notch peut-elle conduire à une augmentation du nombre de cellules neurales ?

La sélection des cellules neurales au sein d'une population de cellules neurectodermes repose sur un phénomène appelé inhibition latérale. Au départ, toutes les cellules neurectodermes sont toutes équivalentes et compétentes pour devenir des neuroblastes. En effet ces cellules s'inhibent réciproquement pour l'acquisition de l'identité neurale. Cependant, du fait des fluctuations internes, une des cellules « prend le dessus », rompt l'équilibre et devient plus inhibitrice que ses voisines. Tout en inhibant l'identité neurale dans ses voisines, elle les rend également incapables de produire le signal inhibiteur. Cette cellule, étant libérée de l'inhibition, devient le



**Figure 13 : La voie Notch et la formation du système nerveux central de l'embryon de drosophile**

(A-B) Formation du système nerveux central de l'embryon de drosophile. Adapté de Skeath et Thor, 2003. (A) L'embryon de drosophile est subdivisé par l'expression de gènes de polarité segmentaire (noir et gris) et columnaire (bleu, jaune et vert). Dans le neurectoderme, des groupe proneuraux (astérisque blanche) se forment à l'intersection de ces bandes, chacun exprimant ainsi des gènes différents. (B) Par inhibition réciproque, les cellules du groupe proneural expriment *aschète* (*ac*) et *scute* (*sc*) à des niveaux similaires (orange). Par inhibition latérale, une cellule est sélectionnée pour devenir le neuroblaste et elle induit une diminution du niveau d'*Ac/Sc* dans les cellules voisines (jaune). Le neuroblaste délamine et génère les cellules du système nerveux central (GMC et autres). (C) Schéma du réseau de gènes impliqués dans l'inhibition réciproque (haut) et l'inhibition latérale (bas). La taille des noms de gènes reflète leur niveau d'expression. Le récepteur Notch en rose, le ligand Delta en bleu. Adapté de Schweisguth et al. 1996.

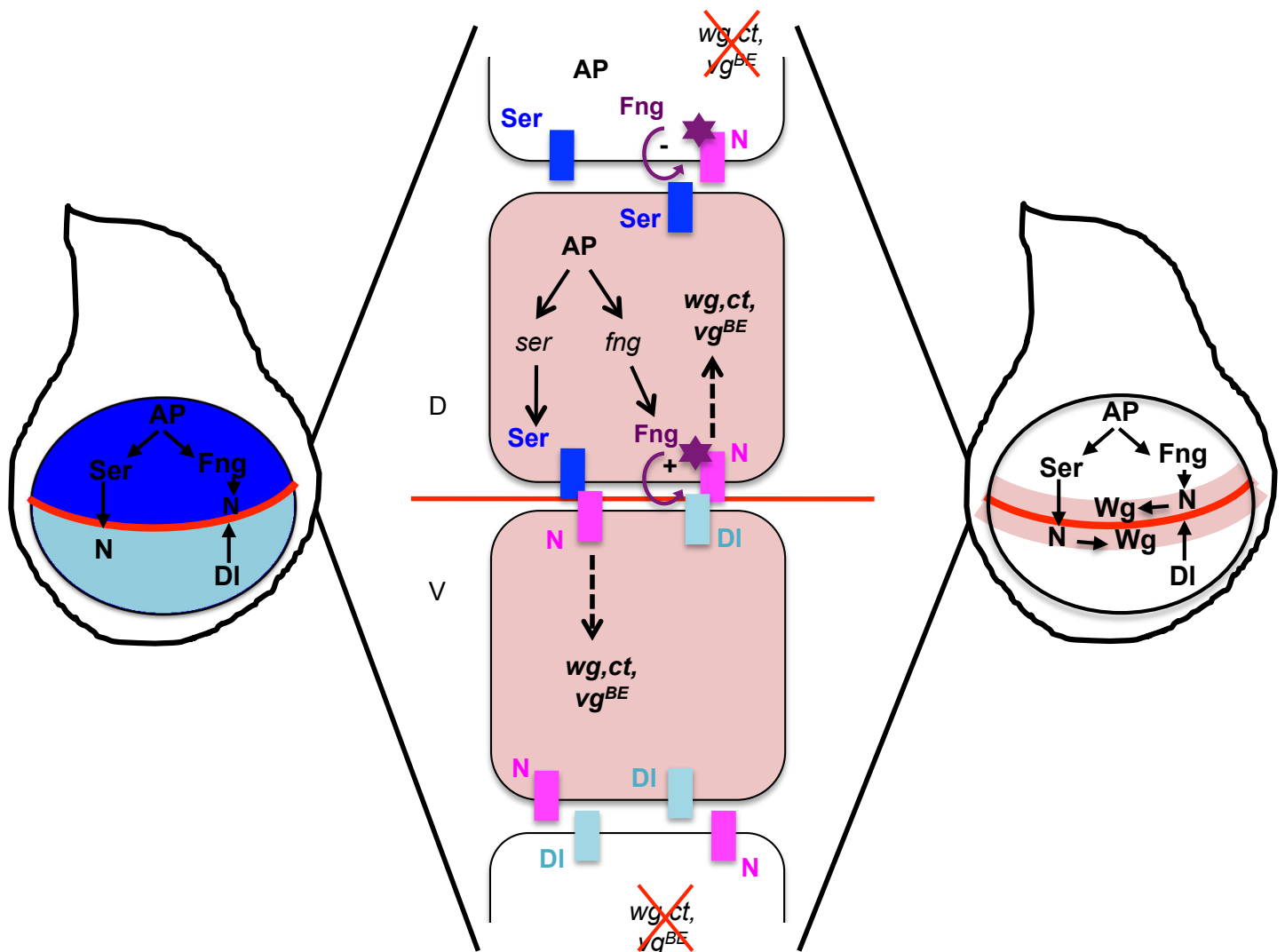
futur neuroblaste. Les cellules voisines, toujours inhibées, vont alors acquérir l'identité épithéliale. Quels facteurs donnent aux cellules neurectodermes la capacité de former des neuroblastes ? Quel est ce signal que le futur neuroblaste envoie à ses voisines ?

Concernant le premier point, lors de l'embryogenèse des signaux vont diviser la corde ventrale en différentes sous-unités exprimant chacune une combinaison particulière de facteurs de transcription (Fig.13A). Au sein de chacune de ces subdivisions, un groupe de cellules commence à exprimer les gènes proneuraux du complexe AS-C : *achaete* (*ac*) et *scute* (*sc*) (Fig.13B et 13C). La perte de fonction de ces facteurs provoque une diminution du nombre de neuroblastes et réciproquement une augmentation de leur dose provoque une hyperplasie neurale (Jiménez et Campos-Ortega, 1990). Ainsi les facteurs du complexe AS-C rendent ces cellules compétentes pour devenir neuroblaste, définissant ce qu'on appelle un groupe pro-neural.

Parmi les cellules du groupe pro-neural, le premier indice de sélection du neuroblaste est une augmentation de l'expression des facteurs du complexe AS-C dans une seule cellule (Fig.13B). Le niveau d'expression de ces facteurs continue d'augmenter dans cette cellule et de diminuer dans ces voisines jusqu'à ce que, à terme, leur expression soit restreinte uniquement à la cellule sélectionnée (Skeath et Carroll, 1992). Lors d'une perte de fonction de Notch, la restriction de l'expression de *ac* n'est plus observée et le nombre de neuroblastes augmente en conséquence (Skeath et Carroll, 1992). Ainsi, Notch serait le signal qui permettrait l'extinction de l'expression d'Ac dans les futures cellules épidermales qui réprimerait l'identité neurale (Heitzler et Simpson, 1991 ; Seugnet et al., 1997). Comment Notch participe-t-il à l'inhibition latérale ?

Initialement, les cellules du groupe proneural possèdent toutes à leur surface le récepteur Notch et son ligand Delta en quantité équivalente les unes par rapport aux autres (Fig.13C, haut). Le signal Notch est donc au départ activé dans toutes les cellules du groupe proneural. Cependant, dans une seule cellule du groupe proneural l'expression de *Delta* est légèrement augmentée (Fig.13B, bas). Cette augmentation induit une activation plus forte de la voie Notch dans les cellules adjacentes, ayant pour conséquence l'inhibition de l'expression des gènes proneuraux (via l'activation de la production des répresseurs transcriptionnels codés par le locus *Enhancer of split*). Parallèlement, les facteurs proneuraux, toujours exprimés dans le futur neuroblaste, activent l'expression de *Delta*, le rendant plus apte à activer Notch dans ses voisines (Kunisch et al., 1994). On a donc une boucle de régulation positive (Fig.13C, bas). Dès





**Figure 14 : La voie Notch et la mise en place de l'axe dorso-ventral dans le disque d'aile de drosophile**

Illustration du réseau d'interaction permettant la formation de la frontière dorso-ventrale du disque d'aile. La frontière est représentée par un trait rouge. Gauche : Apterous (AP) induit la production de Serrate (Ser) et Fringe (Fng) dans le futur compartiment dorsal (bleu foncé). Son absence permet l'expression de Delta (DI) dans le futur compartiment ventral (bleu clair). Milieu : Dans le compartiment dorsal, Fringe (violet) modifie post-traductionnellement le récepteur Notch (rose), augmentant son affinité pour Delta (bleu clair). Dans le compartiment ventral, en absence de modification Notch a une plus grande affinité pour Serrate (bleu foncé). L'activation du récepteur Notch ne peut donc se faire que dans deux rangées de cellules de part et d'autre de la frontière. Droite : L'activation de la voie Notch dans les cellules de la frontière induit l'expression de gènes cibles tel que Wingless (Wg).

qu'une des cellules du groupe proneural présente un plus fort niveau de Delta ou des facteurs du complexe AS-C, cette boucle va permettre une amplification de cette différence jusqu'à ce qu'une seule des cellules soit engagée dans la voie neurale (Heitzler et al., 1996).

Pour résumer, les facteurs proneuraux rendent un groupe de cellules compétentes pour l'identité neurale. Parmi ces cellules, celle avec le plus haut niveau de ligand Delta est sélectionnée pour devenir le neuroblaste. Grâce aux ligands présents à sa surface, elle active la voie Notch dans ses voisines, inhibant ainsi l'identité neurale. La quantité de ligand présent à la surface d'une cellule va donc contrôler la décision entre identité neurale versus épithéliale.

## (2) *La frontière dorso-ventrale du disque d'aile*

Le rôle de la voie Notch au cours du développement ne se cantonne toutefois pas à la formation du système nerveux. En effet, comme évoqué précédemment, la diminution de dose de Notch induit également l'apparition d'encoches dans l'aile de la mouche. Cet effet est dû au fait que la voie Notch est au cœur de l'organisation de l'axe dorso-ventral du disque d'aile en contrôlant la production du morphogène Wingless (Wg) et du facteur de transcription Cut.

Comme pour la formation de l'axe antéro-postérieur du disque d'aile, la mise en place des compartiments est initiée par l'expression différentielle d'un facteur de transcription, ici Apterous qui est exprimé uniquement dans le futur compartiment dorsal (Diaz-Benjumea et Cohen, 1993). D'une part, Apterous empêche le mélange des cellules ventrales et des cellules dorsales, notamment en induisant la production de molécules d'adhésion différentes entre les deux compartiments (Blair et al., 1994 ; Milan et Cohen, 1999). D'autre part, il active la production de Serrate, un ligand de Notch, et de Fringe, une glycosyl transférase. Dans le compartiment ventral, en absence d'Apterous, Delta, un autre ligand de Notch est exprimé (Fig.14, gauche).

Quant au récepteur Notch, il est présent à la surface de toutes les cellules de la poche de l'aile. Ainsi le récepteur Notch devrait pouvoir se lier avec les ligands également présents, provoquant l'activation de la voie dans tout le disque d'aile. Pourtant, l'activation de ce signal ne se fait que dans deux rangées de cellules de part et d'autre de la frontière dorso-ventrale (Diaz-Benjumea et Cohen, 1995 ; Doherty et al., 1996 ; De Celis et al., 1996). En effet, le ligand des cellules dorsales Serrate n'interagit



qu'avec les récepteurs Notch présents à la surface des cellules ventrales. Réciproquement, le ligand des cellules ventrales Delta se lie uniquement avec les récepteurs Notch à la surface des cellules dorsales. Ceci suppose que le récepteur Notch, en fonction du compartiment où il est présent, n'aura pas la même affinité pour ses deux ligands. Comment l'affinité d'un récepteur peut-elle être modifiée ?

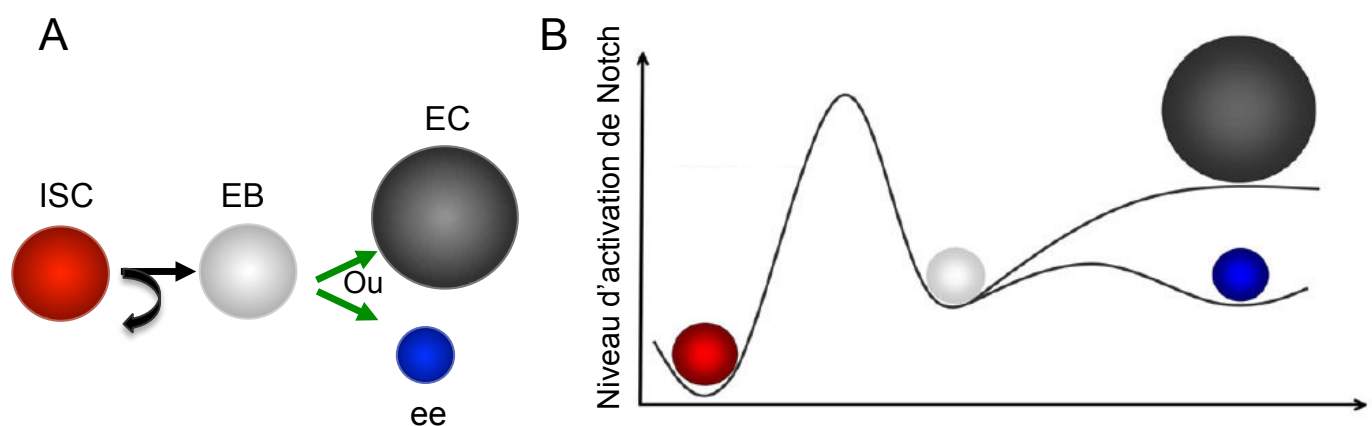
Apterous, exprimé dans le futur compartiment dorsal, active l'expression de *serrate* mais également celle de *fringe*, une glycosyl transférase impliquée dans la modification post traductionnelle de Notch. La modification de Notch par Fringe accroît son affinité pour Delta. En absence de Fringe, Notch n'est pas modifié et a une plus forte affinité pour Serrate. Ainsi, même si Notch est présent dans toutes les cellules du compartiment dorsal, du fait de la présence de Fringe, il est incapable de se lier avec Serrate et réciproquement pour Delta dans le compartiment ventral (Panin et al., 1997 ; Brückner et al., 2000). Cette modification post-traductionnelle fait que le signal Notch ne sera activé que dans deux rangées de cellules, une du côté dorsal par liaison avec Delta et l'autre du côté ventral par liaison avec Serrate (Fig.14, milieu). L'activation de Notch dans les cellules de la frontière dorso-ventrale déclenche l'expression de Wingless, un morphogène sécrété et de Cut, un facteur de transcription (Fig.14, droite). Ces deux facteurs vont contrôler la morphogenèse de l'aile. C'est pourquoi lors d'une diminution de l'activité Notch, cette frontière sera discontinuée avec des zones où Notch ne sera pas activé. Ces « trous » dans la frontière seront à l'origine des encoches observées dans l'aile de l'adulte.

Pour conclure, le signal Notch est également impliqué lors de la mise en place de frontières. Son activation le long de la frontière dorso-ventrale, grâce à un jeu de modification d'affinité, aboutit à la formation d'une aile adulte « normale ». Par ailleurs, la modification de l'affinité de Notch pour ces ligands ajoute un niveau supplémentaire de contrôle de la voie Notch.

### (3) *Cellule souche intestinale*

Dans certains lignages, Notch est activé de manière différentielle entre deux cellules filles. La cellule où la voie est activée prendra une identité particulière alors que sa sœur, en absence de signal, adoptera une identité différente dite « par défaut ».

Ce système est observé dans le lignage des cellules intestinales adultes de drosophile. Ce modèle, récemment développé, repose sur la division de cellules souches



**Figure 15 : La voie Notch et la mise en place l'identité dans l'intestin de drosophile**

(A) Schéma du lignage des cellules souches intestinales de drosophile. ISC, cellule souche intestinale ; EB, entéroblaste ; ee, cellule sécrétrice ; EC, entérocyte. Les flèches noires représentent une division et les flèches vertes un changement d'identité. (B) Schématisation de la relation entre l'activation de la voie Notch et l'acquisition de l'identité dans le lignage des ISCs. Une forte activation de la voie Notch est requise pour inhiber la capacité d'autorenouvellement et l'engagement vers l'identité EB. La transformation de l'EB en ee ou EC dépendrait également de la force d'activation du signal Notch.

Adapté de Perdigoto et al., 2011

intestinales (ISC) disséminées dans la région postérieure de l'intestin moyen. Classiquement, l'ISC génère une nouvelle ISC et un entéroblaste (EB) (Fig.15A). Après sa division, l'ISC active la voie Notch dans l'EB. Par ailleurs la perte de fonction de Notch conduit à une augmentation du nombre d'ISC. Réciproquement, la surexpression de Notch dans les ISC conduit à leur différenciation précoce (Micchelli et Perrimon, 2006 ; Ohlstein et Spradling, 2007 ; Perdigoto et al., 2011). Ceci indique que l'activation de la voie Notch promeut l'identité EB et réprime l'identité ISC (Fig.15B). Une fine régulation de Notch est donc nécessaire afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. Par la suite, l'EB se différencie en deux types cellulaires différents : une cellule sécrétrice entéroendocrine (ee) ou une cellule absorbante entérocyte (EC) (Fig.15A). La décision entre ces deux identités repose sur une différence d'activation de la voie Notch : l'identité EC correspondrait à une forte activation de Notch dans l'EB tandis que l'identité ee serait mise en place quand la voie Notch est plus faiblement activée dans l'EB (Ohlstein et Spradling, 2007 ; Wilson et Kotton, 2008) (Fig.15B).

Pour résumer, l'activation différentielle de la voie Notch entre les cellules d'un lignage est un mécanisme essentiel à l'acquisition des différentes identités cellulaires.

La voie Notch est requise de manière répétée tout au long du développement et même pendant la vie adulte. Elle contrôle de nombreux processus (prolifération, mort cellulaire) mais principalement la mise en place de l'identité cellulaire. Ainsi il est essentiel que l'activation de la voie Notch se fasse au bon endroit et au bon moment. Ainsi de nombreux facteurs ont été identifiés comme régulateurs de la voie Notch. Ces facteurs peuvent agir à différentes étapes de la voie : lors de la liaison ligand/récepteur (émission) ou bien lors de la transduction (réception) du signal. La partie suivante sera consacrée à ces deux types de régulation et aux facteurs connus intervenant dans ce processus.

### **3. Les régulateurs de la voie Notch.**

Les mécanismes de régulation de la voie Notch sont au centre d'un nombre important d'études visant à comprendre comment le signal est établi et pourquoi la réponse transcriptionnelle est aussi variable d'une cellule à l'autre. Et pourtant, malgré une importante liste des régulateurs déjà connus de Notch, de nouveaux facteurs sont constamment mis à jour. Mes travaux m'ayant conduit à analyser les mécanismes de



régulation de la voie Notch, je vais résumer ici les principes sur lesquels je me suis appuyée lors de mes recherches pour établir mes hypothèses de travail.

### (1) *Régulation de l'émission du signal*

La liaison du récepteur Notch à son ligand suppose que ces deux protéines soient présentes et actives à la surface de cellules adjacentes. Le trafic intracellulaire tient une part importante dans la régulation de cette liaison (Revue par Sorkin et von Zastrow, 2009). En effet il régule aussi bien l'activation que l'acheminement à la membrane des ligands et des récepteurs. De plus, des analyses de la localisation subcellulaire de Notch et de son ligand Delta ont montré que dans l'embryon et le disque d'aile de la drosophile, ces protéines sont localisées dans des vésicules intracellulaires (Kooh et al., 1993). Nous allons voir que ce transit dans des vésicules intracellulaires est important lors de la mise en place du signal Notch.

#### a. Le trafic intracellulaire

L'endocytose permet l'exclusion de protéines transmembranaires de la membrane plasmique. Quand une protéine transmembranaire est ubiquitinée, elle va être internalisée dans une vésicule d'endocytose puis transférée vers l'endosome précoce. A partir de là, elle peut être soit recyclée vers la membrane plasmique avec ou sans modification, soit dirigée vers la voie de dégradation.

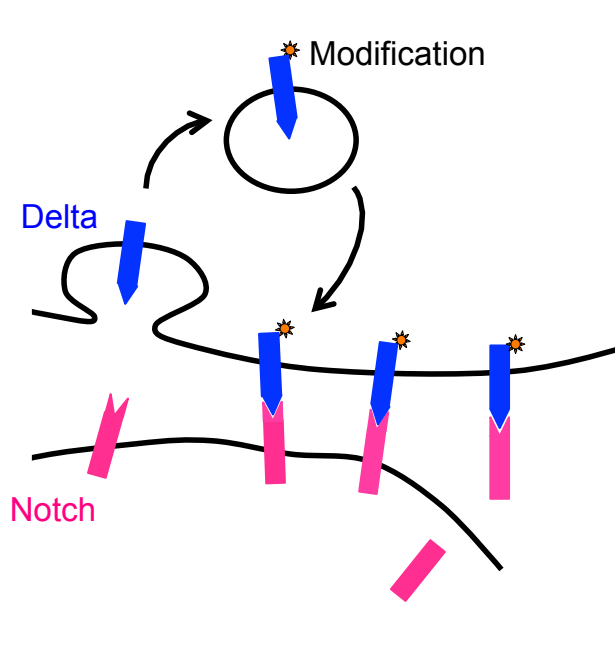
L'endocytose tient une place importante dans la mise en place de la voie. C'est pourquoi la perte de fonction *shibire (shi)*, le gène codant la dynamine, une protéine impliquée dans la formation de vésicules d'endocytose, provoque un phénotype neurogénique caractéristique d'une perte de fonction *Notch* dans l'embryon de drosophile (Poodry, 1990). De plus, des analyses d'interaction génétique ont montré que dans la cellule émettrice et la cellule réceptrice du signal la dynamine/*shi* régule l'activité du ligand et du récepteur (Seugnet et al., 1997b). Ainsi l'endocytose du ligand et du récepteur est requise pour la capacité de la cellule émettrice et de la cellule réceptrice à mettre en place la voie Notch.

#### b. Trafic du ligand dans la cellule émettrice du signal

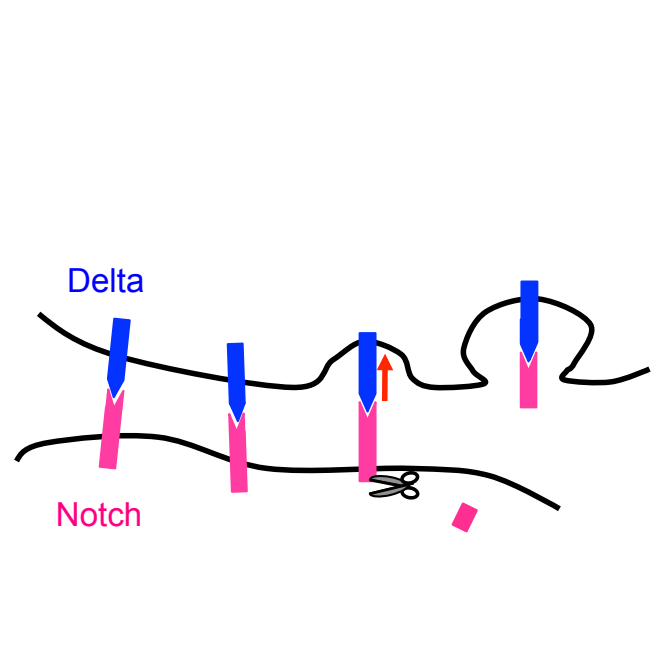
La surexpression d'une forme de Delta ne pouvant pas être endocytosée ne mime pas le phénotype de gain de fonction *Notch* observé lors de la surexpression de Delta (Parks et al., 2000). Ceci indique que la présence de Delta à la membrane n'est pas



**A** Activation du ligand après endocytose



**B** L'endocytose facilite le clivage S2 de Notch



**Figure 16 : Hypothèses sur l'implication de l'endocytose du ligand dans la voie de signalisation Notch**

Illustration des hypothèses sur le rôle de l'endocytose des ligands de Notch dans l'activation de la voie. Notch en rose, Delta/Serrate en bleu (A) Lors de l'endocytose du ligand, une modification post-traductionnelle (étoile) le rend actif et capable d'interagir avec le récepteur Notch. (B) L'endocytose des ligands interagissant avec le récepteur Notch crée une tension mécanique (flèche rouge) facilitant le clivage du récepteur.

suffisante pour induire l'activation de la voie Notch. Ainsi le ligand doit être d'abord pris en charge par le système de trafic intracellulaire avant de pouvoir se lier activement avec le récepteur Notch.

Deux E3 ubiquitine ligases, Neuralized (Neur) et Mind Bomb (Mib), initient l'endocytose des ligands de Notch chez la drosophile et les vertébrés. Leur perte de fonction conduit à des défauts de localisation sub-cellulaire des ligands, corrélés avec des phénotypes similaires à une altération de la voie Notch (Lai et al., 2001 ; Deblandre et al., 2001 ; Itoh et al., 2003 ; Lai et al., 2005). Neur et Mib sont donc deux régulateurs essentiels à l'internalisation et au trafic intracellulaire des ligands de Notch.

Comment un défaut d'internalisation des ligands peut-il conduire à une absence d'activation du récepteur Notch ? Deux hypothèses non exclusives ont été émises : (1) les ligands nécessiteraient, après leur arrivée à la membrane plasmique, un recyclage par l'endosome. Lors de ce processus, ils subiraient une modification post-traductionnelle qui les rendrait capables de se lier au récepteur Notch (Wang et Struhl, 2004 ; Jafar-Nejad et al., 2005 ; Emery et al., 2005), comme lors de la compartimentation dorso-ventrale du disque d'aile (Fig.16A). (2) Après la liaison ligand/récepteur, l'endocytose du ligand créerait une tension mécanique favorisant le clivage S2 du récepteur (Sun et Artavanis-Tsakonas, 1997 ; Klueg et al., 1998 ; Varnum-Finney et al., 2000 ; Gordon et al., 2007) (Fig.16B). Pour l'instant, même si certaines études tendent à valider ces deux modèles, le mécanisme moléculaire conduisant à l'activation de Delta lors du trafic intracellulaire, de même que le lien entre la tension mécanique et le clivage S2, restent à établir.

Pour résumer, que ce soit pour l'activation du ligand ou le clivage du récepteur, le trafic intracellulaire des ligands est un facteur important dans l'émission du signal Notch.

#### c. Trafic du récepteur dans la cellule réceptrice du signal

Une inhibition de l'entrée du récepteur Notch dans l'endosome précoce provoque une diminution de la quantité du récepteur Notch clivé par la  $\gamma$ -secretase, corrélée à une diminution du signal (Vaccari et al., 2008). Comment le trafic intracellulaire du récepteur peut-il influencer son clivage et l'activation du signal Notch dans la cellule émettrice de signal ?

Contrairement au ligand, le récepteur ne semble pas nécessiter d'activation via un mécanisme dépendant du recyclage intracellulaire. Cette activation dépendrait plutôt de



modifications post-traductionnelles des répétitions EGF lors de la maturation du récepteur (Shi et Stanley, 2003 ; Sasamura et al., 2003). Ainsi, dès son arrivée à la membrane il peut interagir avec son ligand. Mais que deviennent les récepteurs qui ne sont pas utilisés?

Tout comme le ligand, l'internalisation du récepteur Notch est initiée par trois E3 ubiquitine ligases, Deltex (Dx), Suppressor of deltex (Su(dx)) et DNedd4. Si l'implication de Dx dans la modulation du signal est dépendante du contexte cellulaire, Su(dx) et DNedd4 promeuvent l'ubiquitination des récepteurs Notch non tronqués et leur acheminement vers la voie de dégradation. Or la perte de fonction *Su(dx)* ou *dNedd4* induit des phénotypes de type gain de fonction pour Notch (Wilkin et al., 2004 ; Sakata et al., 2004). Ceci suggère que l'élimination des récepteurs non utilisés est nécessaire pour empêcher une activation ectopique de la voie. En accord avec cette idée, la perte de fonction de protéines impliquées dans la voie de dégradation provoque une accumulation de Notch dans l'endosome et surtout une activation de la voie Notch indépendante du ligand (Vaccari et Bilder. 2005).

Pour résumer, la régulation de la présence des récepteurs Notch à la membrane empêche que la voie soit activée de manière ectopique ou à des niveaux plus élevés.

En conclusion, l'endocytose est une composante importante dans la régulation de l'émission du signal Notch et il est nécessaire d'envisager d'étudier ce phénomène lorsqu'on observe une perturbation dans l'activation de cette voie.

## (2) *Régulation de la réponse transcriptionnelle au signal Notch*

Comme nous l'avons vu précédemment, après clivage du récepteur Notch, la partie intracellulaire est transloquée dans le noyau où elle convertit le complexe répresseur en complexe activateur, induisant l'expression de gènes cibles jusqu' à lors réprimés. Cependant, comme nous l'avons vu, un même gène répondra différemment à l'activation de la voie en fonction du contexte cellulaire, autrement dit de la présence d'autres facteurs. Comment le contexte cellulaire peut-il influencer la régulation transcriptionnelle des cibles des Notch ? Quels sont les facteurs impliqués et comment agissent-ils ?



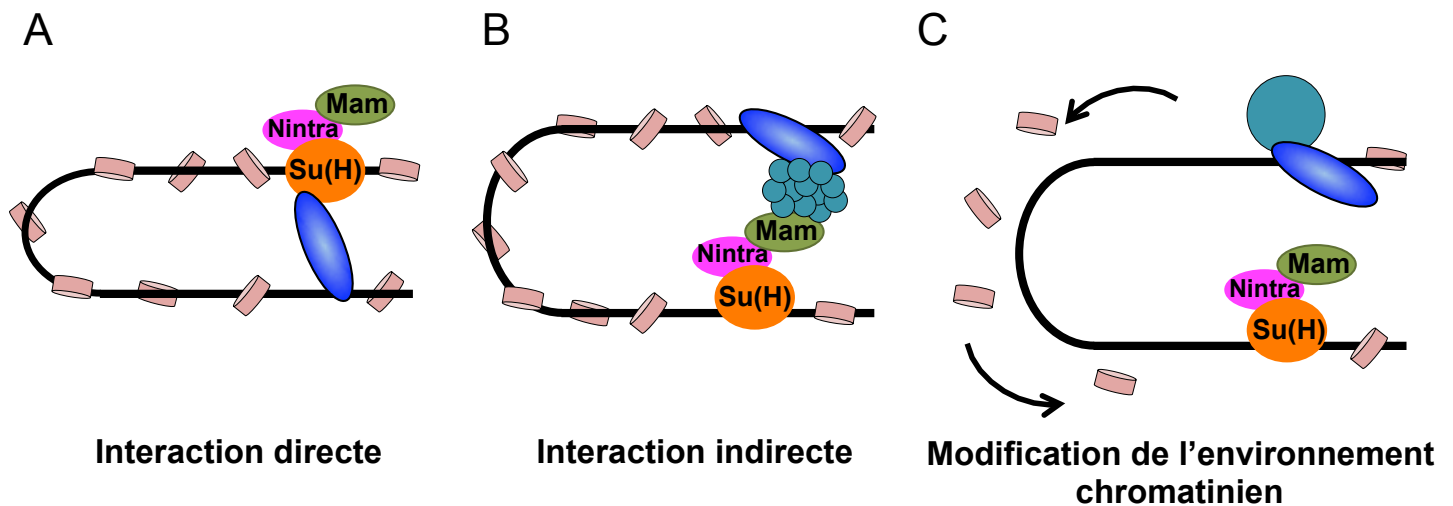
#### a. Action du complexe activateur en synergie avec d'autres facteurs

Comme les expériences de Furriols et Bray (2001) décrites précédemment le démontrent, le complexe activateur n'est pas capable seul d'établir le niveau d'expression normal d'un gène cible de Notch (dans cet exemple *E(spl)m8*). Il nécessite l'action synergique d'autres facteurs (dans cet exemple Grh). Plusieurs facteurs ont été montrés comme contribuant à l'activation de gènes cibles de Notch.

Comme nous l'avons vu précédemment, les facteurs Achaete, Scute et Lethal of scute, des protéines de type bHLH, sont exprimés dans le groupe de cellules proneurales d'où sont issus les neuroblastes. Des études ont montré que ces facteurs interagissent avec la voie Notch en régulant l'expression des gènes *E(spl)* lors du processus d'inhibition réciproque précédant la mise en place de l'inhibition latérale (Singson et al., 1994 ; Kramatschek et Campos-Ortega, 1994). En effet, des séquences E-Box correspondant au site de fixation des facteurs proneuraux de type bHLH ont été identifiées en amont de certains gènes du locus *E(spl)* (Kramatschek et Campos-Ortega, 1994 ; Maeder et al., 2005). Par ailleurs, une mutation de ces E-box induit une perte de l'expression des gènes *E(spl)* bien que la voie Notch soit active (Kramatschek et Campos-Ortega, 1994). Ces données indiquent que les facteurs proneuraux potentialisent l'expression des gènes cibles de la voie Notch. De plus elles suggèrent que lors de l'inhibition réciproque, les facteurs proneuraux agissent en synergie avec Notch pour établir l'expression des gènes du locus *E(spl)*.

Les facteurs proneuraux ne semblent d'ailleurs pas être les seuls à agir en synergie avec le signal Notch pour activer l'expression de gènes. L'analyse *in silico* des promoteurs de gènes du locus *E(spl)* dans différentes espèces de drosophile a montré que ces régions contiennent des sites de fixation conservés pour de nombreux autres facteurs de transcription (Snail, Grainy Head, Tramtrack, voir Maeder et al., 2005).

Par quels mécanismes moléculaires des facteurs de transcription pourraient-ils collaborer avec Notch pour activer l'expression des gènes? Un premier modèle propose que le facteur de transcription interagirait directement avec le complexe activateur (Fig.17A). Cette interaction conduirait à une stabilisation mutuelle, favorisant ainsi l'activation de l'expression des gènes cibles. Un exemple illustrant ce modèle est l'interaction de Daughterless, un facteur proneural, qui interagit directement avec Su(H). Cette interaction physique entre les deux protéines serait essentielle à l'expression des gènes cibles lors de l'activation du signal Notch (Cave et al., 2005). Cependant cette



**Figure 17 : Hypothèses pour la régulation de la transduction du signal Notch par des facteurs de transcription**

Illustration des hypothèses concernant le mécanisme moléculaire d'interaction entre le complexe activateur de la voie Notch et des co-activateurs. Su(H) en orange, Nintra en rose, Mastermind en vert, co-activateur en bleu (A) Le co-activateur interagirait directement avec le complexe activateur, le stabilisant et potentialisant l'activation de l'expression des gènes cibles. (B) Le co-activateur interagirait avec la machinerie transcriptionnelle (turquoise) et agirait en synergie avec le complexe activateur pour activer l'expression des gènes cibles. (C) Le co-activateur modifierait la chromatine (notamment les histones, ici en rose pâle) contenant les sites de fixation pour le complexe activateur, les lui rendant plus accessibles.

Adapté de Bray et Bernard, 2010

étude montre qu'un tel mécanisme requiert une organisation spatiale bien précise afin que Su(H) soit accessible même en présence de Nttra et Mam. Une modification de l'agencement des différentes séquences anéantit l'effet synergique entre les facteurs (Cave et al., 2005).

Une deuxième possibilité est que cette synergie soit indirecte. En se liant avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle, le complexe activateur et le facteur de transcription activeraient indépendamment l'expression du gène (Fig.17B). La résultante serait une addition des deux activations (Revue par Bernard et Bray, 2010). Ce système permettrait une plus grande flexibilité que le modèle proposé ci-dessus car l'agencement et l'espacement entre les sites de fixation peuvent être moins précis.

Finalement, un troisième modèle propose que les facteurs de transcription modifieraient la configuration chromatinienne du site de fixation pour Notch, le rendant ainsi accessible au complexe activateur (Fig.17C). Contrairement aux modèles précédents, celui-ci ne nécessiterait pas une présence au même moment du facteur de transcription et du complexe activateur. Un tel mécanisme est illustré par l'interaction de la voie Notch avec deux répresseurs épigénétiques du groupe Polycomb, Lola et Pipsqueak. Ces deux facteurs induiraient des modifications de la méthylation des histones, renforçant la répression de certains gènes cibles (Ferres-Marco et al., 2006).

#### b. Répression de la voie Notch par remodelage de la chromatine

Réciproquement la répression de gènes cibles de Notch serait contrôlée par des répresseurs épigénétiques de la famille Polycomb. Une absence de ces facteurs lors de la formation du disque d'œil conduit à une hyperprolifération, caractéristique d'une activation ectopique de Notch (Martinez et al., 2009). La présence de ces facteurs de répression conduirait à devoir augmenter le niveau d'activation de Notch pour induire l'expression de certains gènes cibles.

Ainsi, ce modèle permettrait de maintenir la répression de certains gènes cibles même en présence du complexe activateur. Un facteur pourrait induire une compaction de la chromatine au niveau des sites de fixation pour Notch, bloquant ainsi l'accès pour le complexe activateur en deçà d'un certain seuil d'activation de la voie. En accord avec l'idée que la compaction de la chromatine joue un rôle essentiel dans la transduction du signal Notch, Remaud et al. (2008) ont montré que la réponse à l'activation de Notch varie en fonction des phases du cycle cellulaire. En effet, lors des phases du cycle où l'ADN est peu condensé (phase S de réplication), les cellules sont plus réceptives à





l'activation de Notch comparé à des phases où l'ADN est plus condensé (phase G2 de croissance). De plus, la surexpression de Heterochromatin Protein 1 (HP1), un facteur promouvant la compaction de la chromatine, renforce la résistance des cellules à l'activation de Notch (Remaud et al., 2008).

Pour résumer, les facteurs présents dans la cellule peuvent participer à la réponse transcriptionnelle des gènes après activation de Notch. La liste de ces facteurs est en constant accroissement. La compréhension de leur mode d'action aide à mieux comprendre la variabilité de la réponse transcriptionnelle lors de l'activation de la voie Notch.

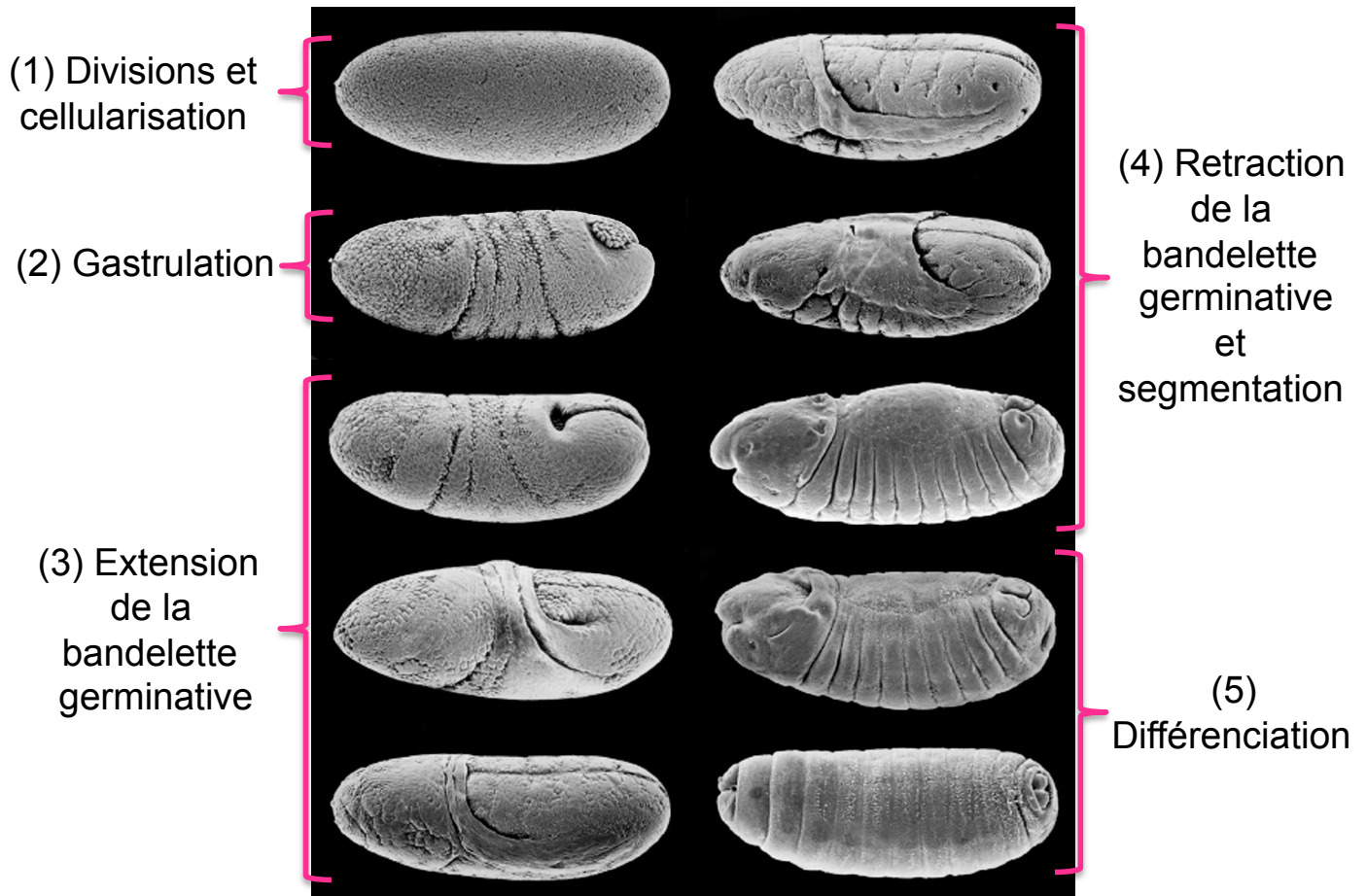
### **III. Le modèle : les soies mécanosensorielles de la drosophile**

Comme vous avez pu le voir au cours des deux chapitres précédents, la diversification cellulaire repose sur une grande variété de mécanismes de détermination. Que ce soit les signaux extrinsèques ou intrinsèques, de nombreux facteurs sont en jeu. L'utilisation combinée de ces différents types de signaux crée un « code moléculaire » spécifique à la cellule qui va alors adopter l'identité et les caractéristiques cellulaires correspondantes. Cependant, dans la plupart des lignages cellulaires, les mécanismes de détermination cellulaire connus ne parviennent pas à expliquer totalement la diversité cellulaire résultante. De même, l'établissement des différents signaux de détermination reste souvent mal compris. Ceci implique que d'autres facteurs intervenant dans ces processus restent à découvrir.

Une illustration parfaite de ce phénomène est retrouvé dans mon modèle d'étude : le lignage des soies mécanosensorielles de la drosophile. Les cellules composant ces organes sont formées à partir d'un lignage cellulaire simple, stéréotypé et comportant des types cellulaires variés. Dans ce chapitre, je vais dans un premier temps vous présenter brièvement le modèle de la drosophile ainsi que son développement. Enfin, je décrirai le lignage des soies mécanosensorielles et les principaux mécanismes connus qui sont à l'origine de la diversité cellulaire dans ce modèle.

#### **1. Le développement de la drosophile**

*Drosophila melanogaster*, aussi appelée la mouche du vinaigre, est un insecte de l'ordre des Diptères (caractérisé par la présence d'une seule paire d'aile et d'une paire



**Figure 18 : Principales étapes de l'embryogenèse de la drosophile**

Photographies représentant les phases majeures du développement embryonnaire de la drosophile : (1) Après la fécondation, une succession de divisions forme le blastoderme syncytial. Après 13 divisions, durant la cellularisation, les noyaux migrent vers la périphérie de l'embryon et sont peu à peu englobés par des invaginations cytoplasmiques. (2) Au cours de la gastrulation, les cellules mésodermiques migrent vers l'intérieur de l'embryon (3) Par un processus d'intercalation cellulaire, l'embryon s'étend selon un axe antéro-postérieur et se replie sur lui même. Durant cette période, les premiers signes de segmentations apparaissent avec les parasegments (4) Rétraction de la bandelette germinative. Apparition des segments. (5) Différenciation du système nerveux périphérique

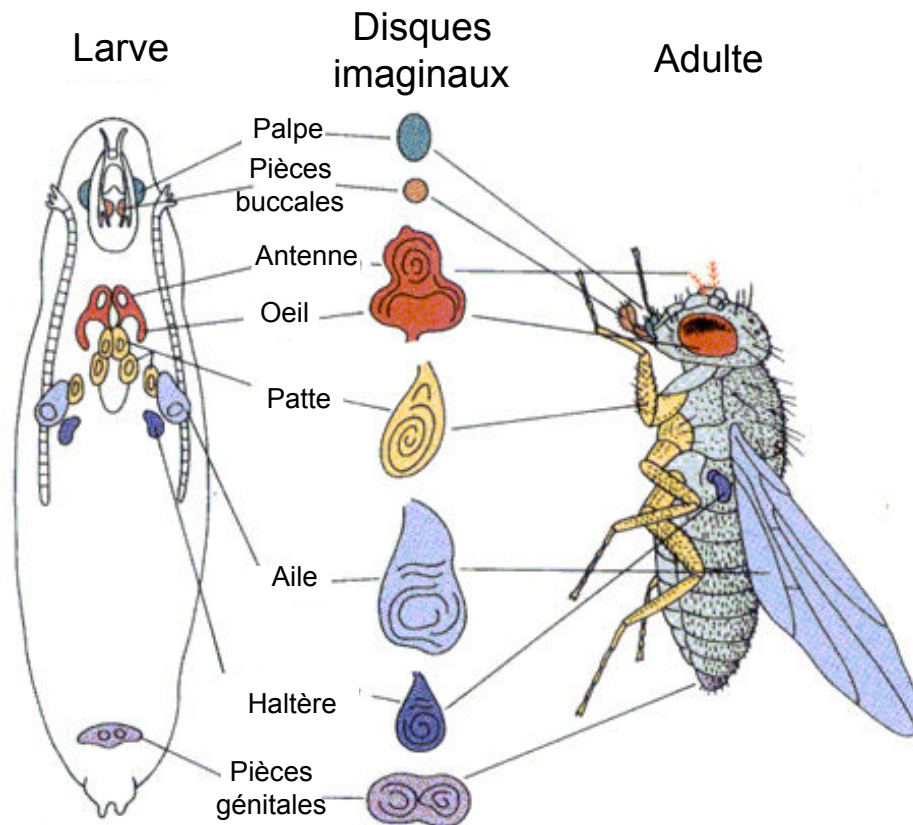
de balanciers). Ce petit insecte de quelques millimètres, utilisé comme modèle biologique depuis le début du XXème siècle, possède 4 paires de chromosomes (dont une paire de chromosomes sexuels) comportant 15 000 à 20 000 gènes. Du fait des nombreux outils génétiques, cellulaires et moléculaires disponibles, la drosophile est aujourd'hui un modèle flexible et très puissant qui permet de disséquer finement les arcanes de la machinerie cellulaire.

### (1) *Cycle de vie*

La drosophile adulte peut vivre jusqu'à 3 semaines. Son développement est composé de trois phases : embryonnaire, larvaire et pupale. Il dure entre 10 à 12 jours à 25°C. L'embryogenèse dure environ 24h et débouche sur la naissance d'une larve mobile. La phase larvaire dure cinq jours et quand la larve atteint une taille critique, elle entre dans la phase pupale (3 jours) où elle s'immobilise et forme une coque dure (cage pupale). Durant cette phase, appelée métamorphose, une grande majorité des tissus larvaires est lysée et les organes de l'adulte sont formés à partir de petites populations de cellules précurseurs spécifiées dès l'embryogenèse : les disques imaginaux. A la fin du stade pupal, la pupa devient une pharate, autrement dit une mouche adulte juste avant l'éclosion. Après sa sortie de la cage pupale, la mouche adulte est sexuellement mature au bout de quelques heures. Après reproduction, une femelle peut pondre jusqu'à 200 œufs.

### (2) *L'embryogenèse (Fig.18)*

Après fécondation, le zygote effectue une série de 14 divisions cellulaires dépourvues de cytokinèse générant un syncytium. Entre la 10ème et 14ème divisions, les noyaux migrent vers le cortex et sont peu à peu englobés par des invaginations cytoplasmiques : c'est l'étape de cellularisation. Lors de la gastrulation, les cellules du côté ventral correspondant au mésoderme migrent à l'intérieur de l'embryon grâce à un processus de modification d'adhérence cellulaire appelé transition épithelio-mesenchymateuse. Par la suite, l'embryon par un processus d'intercalation cellulaire s'étend selon un axe antéro-postérieur tout en se repliant sur lui même avant de se contracter de nouveau (extension et rétraction de la bandelette germinative). Pendant cette étape, les différents segments de l'embryon sont mis en place et la région céphalique est spécifiée. Ces processus aboutissent à la formation d'un organisme segmenté avec à chaque extrémité une tête et un telson. Cette segmentation se retrouve



**Figure 19 : Correspondance entre disques imaginaires larvaires et structures adultes.**

Durant le stade larvaire, la drosophile développe de petits sacs de cellules précurseurs, appelés disques imaginaux, qui vont donner la quasi totalité des structures de l'adulte. Ce schéma représente la localisation des différents disques dans la larve ainsi que les différentes structures adultes qu'ils génèrent.

dans la disposition des muscles et du système nerveux périphérique qui se forment peu après la mise en place des segments.

### (3) *Vie larvaire*

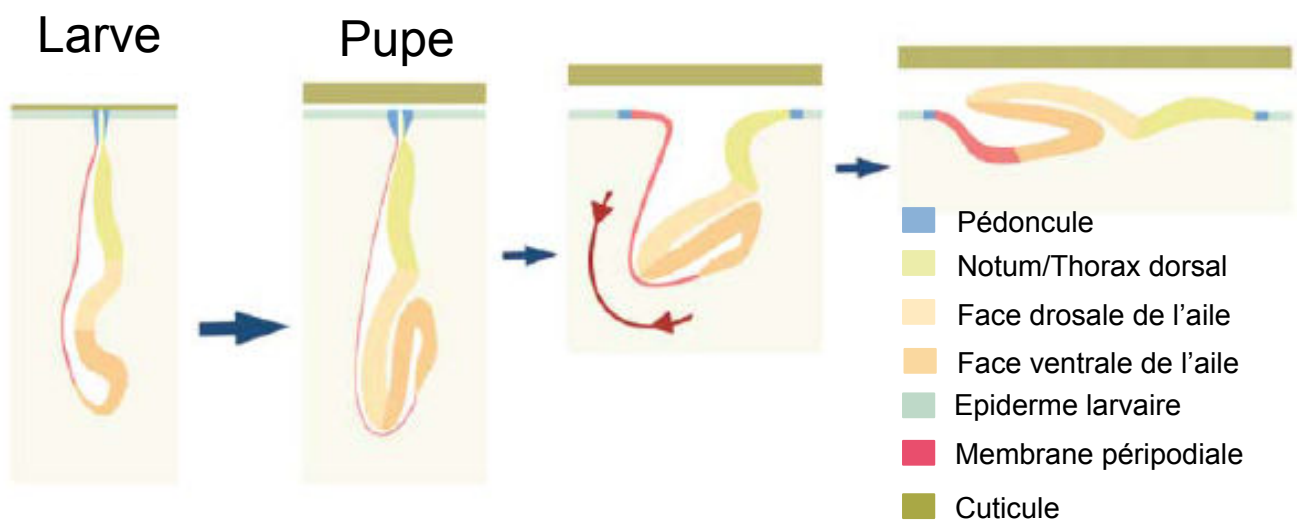
A la fin de l'embryogenèse, la jeune larve éclot. La vie larvaire est découpée en trois stades larvaires entrecoupés de 2 phases de mues entre lesquelles la larve se nourrit intensément, augmentant ainsi sa masse de près de 200 fois. Pendant cette période, la larve développe des « sacs » de cellules précurseurs, appelés disques imaginaux, qui seront à l'origine des structures adultes lors de la pupaison.

### (4) *La métamorphose : exemple de la formation de l'aile et du notum*

La métamorphose correspond au remaniement complet des structures de l'organisme. A partir d'une larve rampante et stérile, un individu capable de voler et de se reproduire est formé. Pour permettre une telle transformation, une grande majorité des tissus larvaires est histolysée. Les différents organes de l'adulte sont formés à partir des disques imaginaux, à l'exception de l'intestin et du cerveau (Fig.19).

Chaque disque imaginal d'aile est composé par un épithélium monostratifié (à l'origine des tissus adultes) recouvert par un épithélium squameux appelé membrane péripodiale. Alors que le disque d'aile est une monocouche cellulaire à l'intérieur de la cavité larvaire, l'aile adulte se compose de deux feuillets opposés, liés l'un à l'autre par la marge de l'aile. Comment au cours de la métamorphose passe-t-on d'un épithélium monostratifié interne au corps de l'animal à deux feuillets superposés externes ?

Cette transition implique d'importants mouvements cellulaires au cours d'un processus appelé évagination. En effet les cellules au niveau de la frontière dorso-ventrale de la poche du disque d'aile sont « tirées » vers l'extérieur, initiant ainsi l'évagination (Fig.20). Cette région sera à l'origine de la marge de l'aile. Du fait de l'évagination, les cellules de part et d'autre de cette frontière se superposent formant ainsi les deux feuillets de l'aile adulte. Au cours de ce processus, les interactions cellulaires sont profondément remaniées permettant ainsi que les deux feuillets adhèrent entre eux (Fristrom et al., 1993). Les structures autour de la poche de l'aile donnent la charnière de l'aile. L'extrémité la plus dorsale du disque forme une moitié du notum, qui à la fin de l'évagination rejoint l'autre moitié (formée par le 2<sup>ème</sup> disque d'aile) et fusionne avec elle lors de la fermeture thoracique.



**Figure 20 : Eversion du disque d'aile de drosophile**

Le disque d'aile est attaché à l'épiderme par un pédoncule (bleu). Lors de la métamorphose, la contraction de la membrane péripodiale (rouge) et la fait qu'elles envahissent l'épithélium (vert clair) sus-jacent permet l'éversion et la sortie vers l'extérieur de l'organisme de l'aile (orange) et du notum (jaune).

Que ce soit dans la fermeture thoracique ou dans l'évagination du disque, la membrane péripodiale joue un rôle primordial. Au début de la métamorphose, les cellules de la membrane péripodiale, en interaction avec la membrane basale (une forme de matrice extracellulaire hyperspécialisée), se contractent intensément et suite à une transition épithélio-mésenchymateuse, envahissent les tissus larvaires adjacents, les perforant et permettant ainsi la libération du disque d'aile éverté (Pastor-Pareja et al., 2004 ; Srivastava et al., 2007). Une altération de ce processus (par exemple en bloquant la voie JNK) conduit à une absence d'éversion du disque et donc à une absence d'une moitié du thorax chez l'adulte. Concernant la fermeture thoracique, là encore la membrane péripodiale participe à la fusion des deux hémi-thorax. Une diminution de l'activité de la voie des kinases c-Jun N-terminal (JNK) uniquement dans les cellules de la membrane péripodiale aboutit à un défaut de fermeture dorsale (Agnès et al., 1999 ; Tripura et al., 2011).

Pour résumer, la formation des structures adultes à partir des disques imaginaux requiert de nombreuses modifications de la morphogenèse cellulaire : une modification des cellules de la membrane péripodiale qui permet la sortie du disque mais également une modification des interactions cellulaires permettant ainsi de passer d'un épithélium monocouche à une structure composée de deux feuillets superposés.

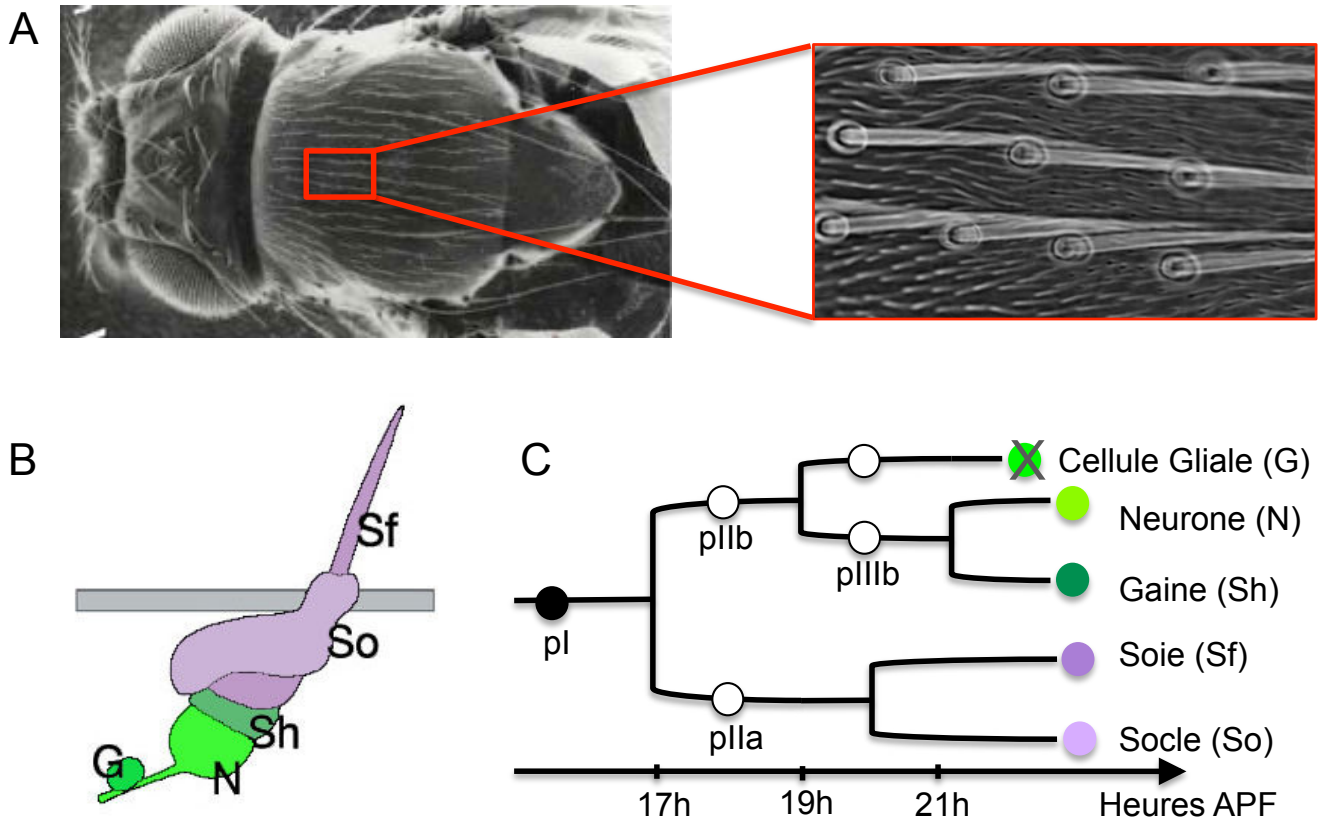
## **2. Le lignage de soies mécanosensorielles**

Les soies mécanosensorielles font partie du système nerveux périphérique de la drosophile. Ces structures, disséminées sur tout le corps de l'animal, sont sensibles aux flexions mécaniques de la soie. Ces organes peuvent être subdivisés en deux catégories : les microchaetes (petite soies) et les macrochaetes (grandes soies). Les microchaetes, et plus particulièrement celles du thorax dorsal (ou notum), ont été extensivement étudiées au cours des trente dernières années et correspondent au modèle que j'ai le plus utilisé au cours de ma thèse (Fig.21A).

### *(1) Description du lignage*

Ces organes sont composés de deux cellules externes, (la cellule soie et la cellule socle) et de deux cellules internes (le neurone et la cellule gaine) (Fig.21B). Toutes ces cellules sont formées à partir d'une cellule précurseur unique (pI), sélectionnée parmi un groupe de cellules proneurales via l'inhibition latérale.





**Figure 21 : Le lignage des soies mécanosensorielles**

(A) Photographie montrant le thorax dorsal d'une drosophile adulte. A droite un grossissement des organes mécanosensoriels du thorax. (B) Schéma d'un organe mécanosensoriel. Il est composé de deux cellules externes (violet) et de trois cellules internes (vert). (C) Lignage cellulaire donnant naissance aux cinq cellules de l'organe mécanosensoriel. En violet sont représentées les cellules donnant les structures externes et en vert les cellules donnant les structures internes. Noter que la cellule gliale meurt et ne participe pas à la formation de l'organe final. G, cellule gliale ; N, neurone ; Sh, cellule gaine ; Sf, cellule soie ; So, cellule socle ; APF, après la formation de la puppe

La cellule pI se divise dans le plan de l'épithélium environ 17h après formation de la pupa (APF) pour donner deux précurseurs secondaires : une cellule postérieure pIIa à l'origine des cellules externes et une cellule antérieure pIIb générant les cellules internes. Concernant la formation du sous lignage interne, la cellule pIIb se divise à 19h APF, générant une nouvelle cellule précurseur pIIIb et une cellule gliale qui meurt par apoptose quelques heures après sa formation (Gho et al., 1999 ; Fichelson et Gho, 2003). Par la suite, la cellule pIIIb engendre vers 20h APF les cellules internes du lignage : le neurone et la gaine. Concernant la formation du sous lignage externe, la cellule pIIa donne directement naissance environ 20h APF aux cellules externes de l'organe : la soie et la socle (Fig.21C).

Dans le lignage des soies sensorielles, prolifération et acquisition de l'identité cellulaire sont étroitement mêlées. En utilisant des techniques d'immunomarquage et d'imagerie en temps réel, de nombreuses études ont permis de disséquer une partie des événements conduisant à la formation de ces organes, notamment au niveau du contrôle de la progression des divisions et de la régulation de l'identité dans ces cellules.

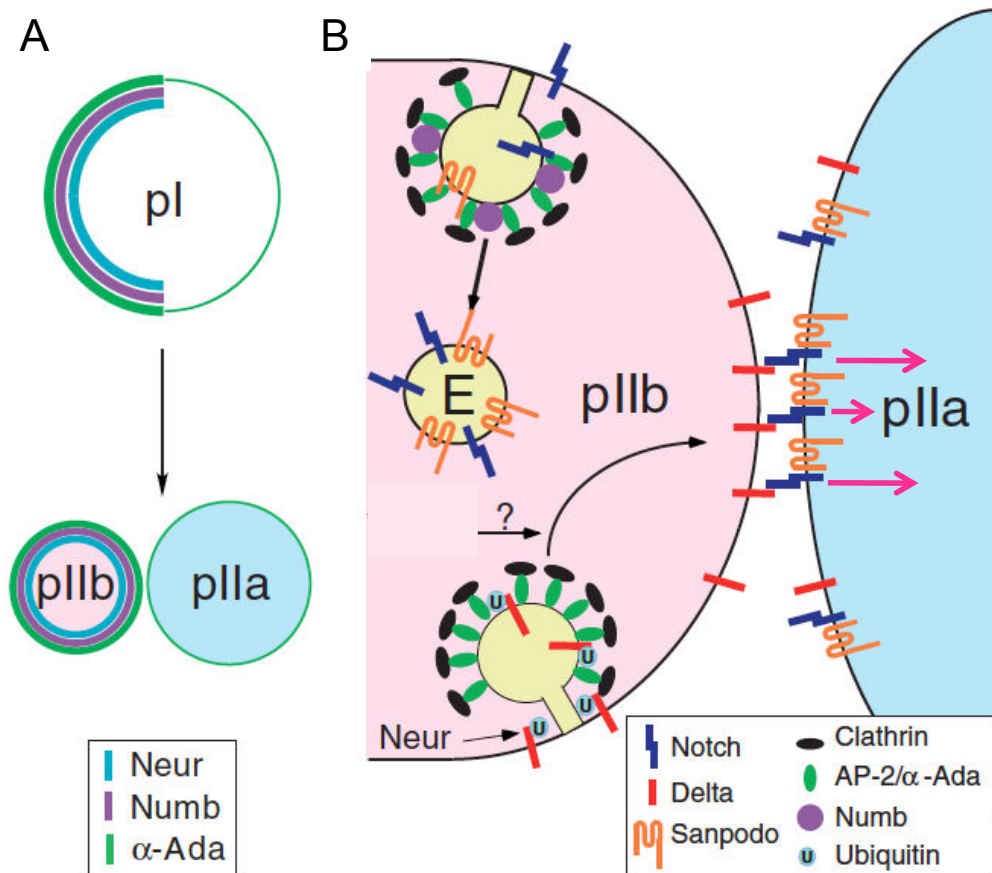
## (2) *Mécanismes de mise en place de l'identité cellulaire dans le lignage des soies mécanosensorielles*

A partir d'une cellule précurseur unique, cinq types cellulaires différents sont générés. Comment une telle diversité est-elle mise en place ? Quels sont les mécanismes de détermination cellulaire en jeu ?

### a. Activation différentielle de Notch

La voie Notch est un mécanisme central dans le contrôle de la diversité cellulaire dans le lignage des soies mécanosensorielles. En effet, cette voie signalisation cellulaire est utilisée itérativement lors de la formation de cet organe et contrôle la destinée des cellules. A chaque division, la voie Notch est différentiellement activée entre les cellules filles (Notch<sup>on</sup> et Notch<sup>off</sup>), leur conférant ainsi des identités différentes.

En considérant la formation des précurseurs secondaires, lors d'une perte de fonction *Notch*, les deux cellules filles acquièrent l'identité pIIb et le lignage n'est composé que de cellules internes. Réciproquement, lors d'un gain de fonction *Notch*, ces cellules acquièrent l'identité pIIa et on observe des soies composées uniquement de quatre cellules externes. L'activation de la voie Notch est donc requise pour l'établissement de l'identité des cellules pIIa (Guo et al., 1996 ; Frise et al., 1996).



**Figure 22 : Activation différentielle de la voie Notch entre les cellules du lignage des soies mécanosensorielles**

(A) Au moment de la division de pl, les facteurs Neuralized (Neur, bleu), Numb (violet) et  $\alpha$ -adaptine ( $\alpha$ -Ada) s'accumulent au pôle antérieur de la cellule. Après la division, ces facteurs sont hérités par la cellule antérieure pIIb. (B) Dans la cellule pIIb (gauche), Les facteurs Numb et  $\alpha$ -adaptine inhibent l'activation du récepteur Notch (bleu) en bloquant le recyclage de Sanpodo/Notch à la membrane plasmique. Neuralized stimule l'activation du ligand Delta (rouge). Dans la cellule pIIa (droite), en absence de Numb, le complexe Notch/Sanpodo est recyclé à la membrane où il peut interagir avec Delta. Cette liaison provoque l'activation du signal Notch (flèches) et la mise en place de l'identité pIIa.

Adapté de Le Borgne et al., 2005.

Pareillement, l'activation différentielle de la voie Notch est essentielle pour la mise en place de l'identité des cellules filles de pIIa (soie et socle) et de pIIb (neurone et gaine). Par exemple, lors d'une perte de fonction continue *Notch*, le lignage sera composé exclusivement de neurones, suggérant une transformation de l'identité pIIa en pIIb puis de l'identité gaine en neurone. Réciproquement, un gain de fonction continu de Notch produit un lignage avec quatre cellules socles, suggérant une transformation de l'identité pIIb en pIIa puis de l'identité soie en socle. Ainsi, à chaque étape de la formation du lignage, la voie de signalisation Notch est un élément essentiel de la détermination cellulaire.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la mise en place de l'activation différentielle de Notch (Fig.22). La répartition différentielle de ces facteurs, notamment lors de la division de pI, aboutit à leur ségrégation dans une seule des cellules filles (Fig.22A). Dans cette partie je vais vous présenter quelques uns de ces facteurs en prenant comme exemple la mise en place du signal Notch entre les cellules pIIa et pIIb. Parmi eux se trouvent notamment le facteur de détermination Numb qui est impliqué dans l'inhibition du signal Notch dans la cellule *Notch<sup>off</sup>* (Guo et al., 1996). La perte de fonction *numb* aboutit à la transformation de la cellule pIIb (*Notch<sup>off</sup>*) en pIIa (*Notch<sup>on</sup>*). Dans la cellule pIIb, Numb interagit avec Sanpodo (Spdo), une protéine transmembranaire associée à Notch, et qui est présente dans pIIa et pIIb. En absence de Numb, comme dans la cellule pIIa, le complexe Spdo/Notch est présent au cortex des cellules (O'Connor-Giles et Skeath, 2003 ; Roegiers et al., 2005). Dans cette cellule, Spdo favorise l'activation du signal Notch, potentiellement en recrutant le complexe  $\gamma$ -secretase (Upadhyay et al., 2012) qui effectue le clivage S3 du récepteur Notch. En revanche, dans la cellule pIIb, le complexe Spdo/Notch est localisé dans des vésicules d'endocytose par un mécanisme dépendant de l' $\alpha$ -adaptine, une sous unité du complexe AP-2, impliqué dans la trafic intracellulaire (Cotton et al., 2013). L'interaction de Numb avec Spdo et AP-2 aboutirait au blocage du recyclage du complexe Spdo/Notch à la membrane (Cotton et al., 2013 ; Couturier et al., 2013 ; Upadhyay et al., 2012). Ainsi, le récepteur Notch est éliminé de la surface de la cellule pIIb ce qui empêche l'activation de Notch dans cette cellule comme c'est le cas en contexte mutant *numb* (Revue par Reichardt et Knoblich, 2013) (Fig.22B).

Comme évoqué précédemment, les ligands de Notch semblent nécessiter un recyclage par le trafic intracellulaire avant d'être capable d'activer le récepteur Notch



(voir introduction chapitre II.3.1). Le lignage des soies ne fait pas exception. L'endocytose du ligand Delta (Serrate n'étant pas présent dans ces cellules) est dépendante de l'ubiquitine ligase Neuralized (Neur). Cette protéine, produite dans la cellule pI et localisée asymétriquement au moment de sa division, est héritée uniquement par la cellule pIIb. Elle favorise le recyclage de Delta et augmente ainsi sa capacité à activer Notch dans la cellule voisine (Le Borgne et Schweisguth, 2003).

Ainsi de nombreux facteurs, pour la plupart utilisés tout au long de la formation du lignage, sont impliqués dans l'établissement de l'activation différentielle de Notch.

#### b. Divisions asymétriques

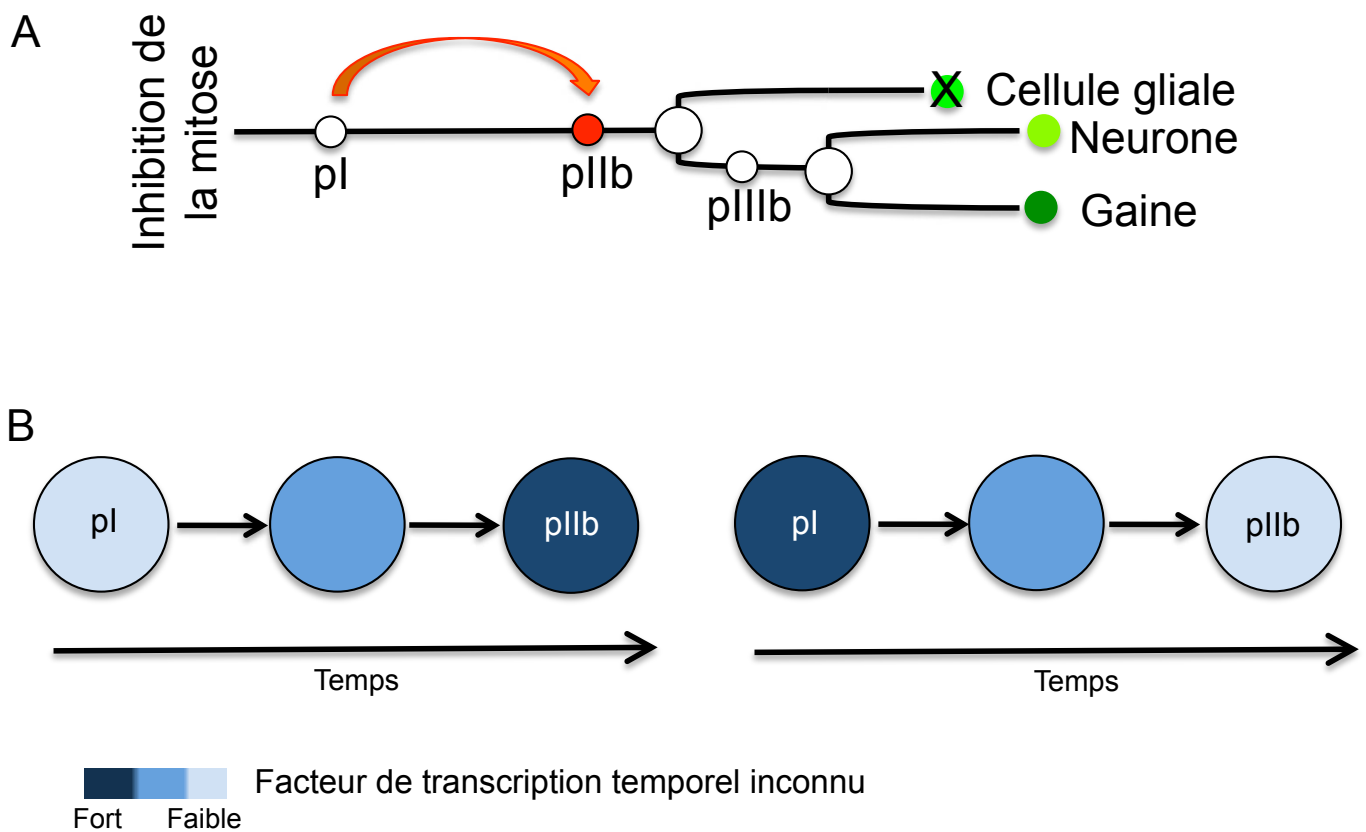
Comme vous avez pu le constater dans les exemples que j'ai évoqués ci-dessus, la division asymétrique joue un rôle essentiel dans l'activation différentielle de la voie Notch. En effet, une inhibition de la localisation asymétrique de ces facteurs provoque un gain ou une perte de fonction *Notch*. Mais comment la localisation asymétrique de ces facteurs est-elle mise en place dans le lignage ?

Lors de la division asymétrique, la localisation des déterminants cellulaires est contrôlée par la polarisation de la cellule (voir introduction chapitre I.2.1.a). Dans le lignage des soies, les facteurs impliqués dans la polarité planaire du tissu contrôlent la polarisation de la cellule pI. Notamment Frizzled et Dishevelled définissent le pôle postérieur de pI alors que Strabismus et Prickled définissent le pôle antérieur. (Gho et Schweisguth, 1998 ; Revue par Segalen et Bellaïche, 2009). Ces facteurs dirigent la mise en place de domaines corticaux à chaque pôle de la cellule : Bazooka/Par6/Drosophila aPKC formant un domaine postérieur et Disc Large/Partner of inscutable/Gai formant un domaine antérieur (Bellaïche et al., 2001). Par la suite, les domaines corticaux dictent la localisation des déterminants cellulaires. Par exemple, le domaine cortical postérieur promeut la localisation antérieure du facteur de détermination Numb en l'excluant du pôle postérieur (Bellaïche et al., 2001 ; Smith et al., 2007).

Ainsi division asymétrique et activation différentielle de la voie Notch sont intrinsèquement liées lors de la formation du lignage de soies mécanosensorielles.

#### c. Un facteur de transcription temporel ?

Cependant la division asymétrique et la voie Notch ne semblent pas être les seuls mécanismes à l'origine de la diversité cellulaire dans le lignage. Dans un contexte d'inhibition de la mitose, la cellule pI acquiert, sans qu'il y ait eu pour autant de division,



**Figure 23 : Hypothèse du facteur temporel dans le lignage des soies mécanosensorielles**

(A) Schéma représentant le lignage des organes mécanosensoriels dans un contexte d'inhibition de la transition G2/M. Noter que la cellule pl acquiert l'identité de sa fille pll sans qu'il y ait de division. (B) Hypothèse d'un facteur temporel contrôlant la transformation de pl en pll. Un facteur de transcription temporel s'accumulerait (gauche) ou serait dégradé (droite) au cours du temps, provoquant la transition de l'identité précurseur primaire à précurseur secondaire.

l'identité de sa fille pIIb et donne un lignage composé des cellules du sous lignage interne (cellule gliale, neurone et gaine) (Fig.23A). Ceci montre qu'en absence de division, la cellule pI effectue une transformation d'identité mère fille (Fichelson et Gho, 2004). De plus, cela suggère qu'un mécanisme temporel permettrait la transition de l'identité précurseur primaire vers l'identité précurseur secondaire (Fig.23B). Ceci n'est pas sans rappeler le mécanisme de détermination contrôlé par les facteurs de transcription temporels observé dans les neuroblastes (voir introduction chapitre I.2.1.b). Cependant, à l'heure actuelle, la présence et l'identité d'un tel type de facteur dans le lignage restent à confirmer.

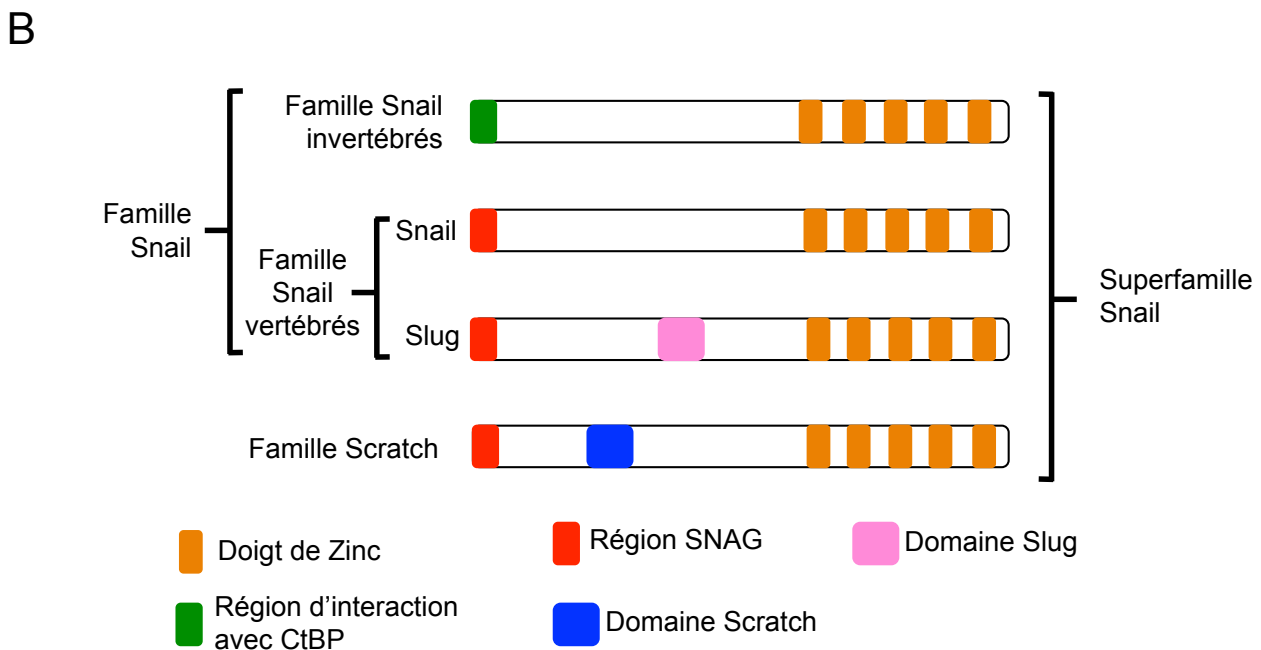
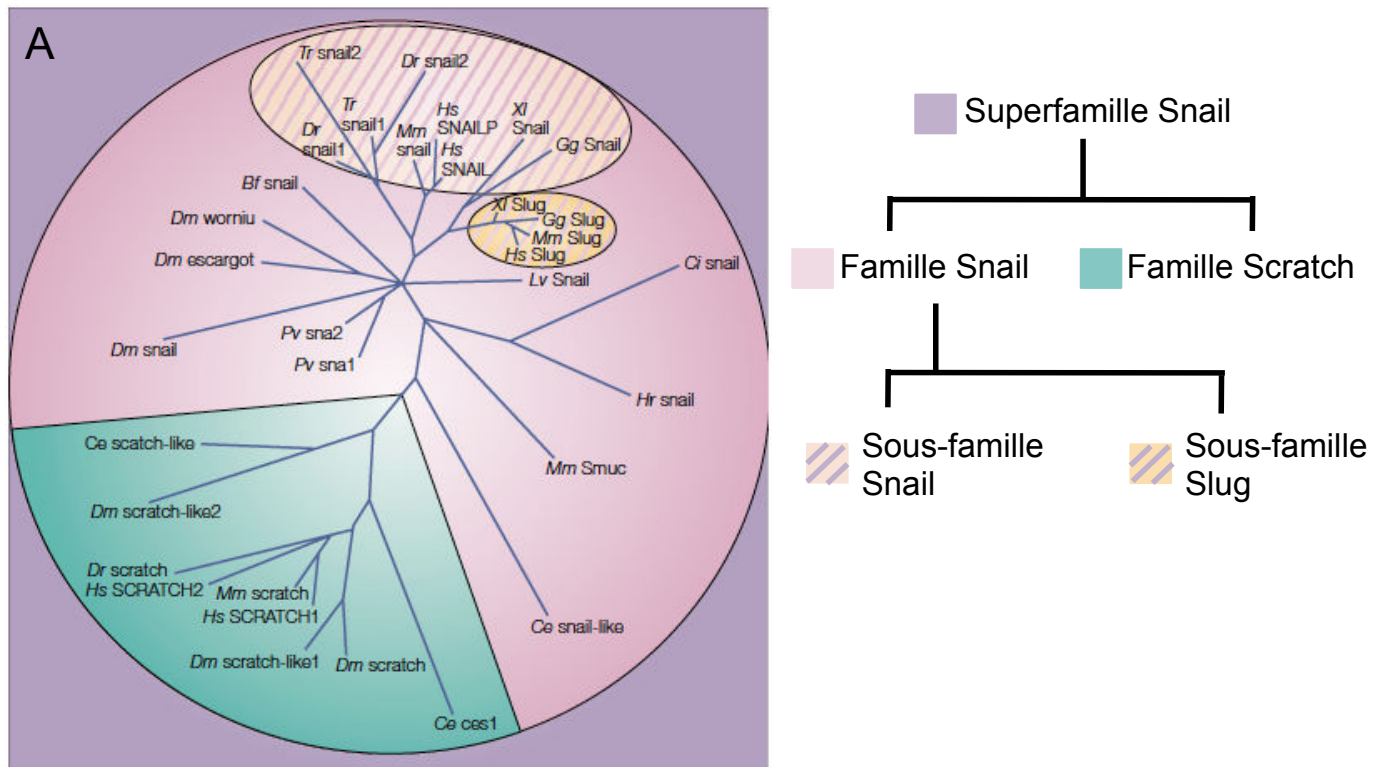
Dans un contexte où la division est bloquée, forcer l'activation de la voie Notch dans la cellule pI induit sa transformation en pIIa et non plus pIIb (Fichelson et Gho, 2004). Par conséquent, il est probable que le facteur temporel contrôle la transition de l'identité précurseur primaire (pI) vers précurseur secondaire (pII) plutôt que la décision entre identité neurale (pIIb) et non-neurale (pIIa) qui elle reposerait sur le signal Notch.

### (3) *Le paradoxe : à la recherche de facteurs contrôlant l'identité cellulaire*

La mise en place de l'identité cellulaire dans le lignage des soies nécessite une activation itérative de la voie Notch à chaque division. Ainsi on pourrait définir l'identité des cellules du lignage en fonction du nombre d'activation de Notch qu'elles ont perçu au cours de la formation du lignage. Cependant, comment un même mécanisme utilisé de manière itérative peut-il conduire à une telle diversification cellulaire ?

Comme nous avons pu le voir avec le facteur temporel contrôlant la transition de pI vers pII, d'autres facteurs semblent impliqués dans la régulation de la détermination cellulaire dans le lignage. Mon objectif lors de ces quatre années de thèse a été de mettre à jour de nouveaux facteurs impliqués lors la diversification cellulaire dans cet organe. Mon intérêt s'est principalement porté sur des facteurs de transcription, différenciellement exprimés dans le lignage et qui sont déjà connus dans d'autres systèmes comme étant impliqués dans la détermination cellulaire. D'après ces critères et des données préliminaires obtenues au laboratoire, j'ai plus particulièrement analysé l'implication des répresseurs transcriptionnels de la superfamille Snail dans la détermination de l'identité des cellules du lignage des soies mécanosensorielles.





**Figure 24 : La superfamille Snail**

(A) Arbre phylogénétique de la superfamille Snail. Image extraite de Nieto, 2001. (B) Représentation des protéines de la superfamille Snail. Les domaines communs ainsi que les domaines spécifiques à chaque famille sont représentés

## IV. La superfamille Snail

La découverte du premier gène de cette famille, le gène *snail*, a été faite chez l'embryon de drosophile. Les embryons mutants *snail* présentent un défaut de gastrulation résultant en un embryon de forme spiralée similaire à un escargot (Grau et al., 1984). De nombreux orthologues ont par la suite été identifiés chez tous les métazoaires (Revue par Nieto, 2002). Ils sont impliqués dans de multiples processus développementaux essentiels à la formation des organismes tel que le cycle cellulaire, la détermination cellulaire, la morphogénèse cellulaire ou la régulation de la mort cellulaire.

### 1. Caractéristiques des protéines de la superfamille Snail

Les protéines de la superfamille Snail présentent de fortes similitudes et une forte conservation de certains domaines entre homologues mais également orthologues (Fig.24A). Ces facteurs comportent : (1) une extrémité carboxyle, très conservée, contenant des sites de liaison à l'ADN en doigt de zinc et (2) une extrémité amine plus divergente, comportant des séquences spécifiques permettant la classification des différents membres dans deux sous-groupes : la famille Scratch et la famille Snail/Slug) (Fig.24B).

La caractéristique commune à toutes les protéines de cette superfamille est leur extrémité carboxyle comportant des domaines de fixation à l'ADN de type doigt de zinc C2H2 (Fig.24B). Même si le nombre de domaine varie d'une protéine à l'autre, il semble de manière générale être compris entre 4 et 6 (revue par Hemavathy et al., 2000). Ces domaines permettent la fixation sur des séquences nucléotidiques spécifiques appelées E-Box (CAGGTG). De prime abord, ils ont été décrits comme peu tolérants à un changement de la séquence de fixation (Mauhin et al. 1993) mais des données plus récentes, issue d'une analyse globale des sites de fixation des facteurs Snail, indiquent que Snail est capable de se fixer sur des sites alternatifs (Rembold et al., 2014).

Ainsi, suite à leur fixation sur les E-Box, les facteurs de transcription de la superfamille Snail régulent l'expression des gènes en aval. Leur fonction la mieux décrite est celle de répresseurs transcriptionnels agissant sur de courtes distances (Gray et Levine, 1996 ; Nibu et al., 1998). Les protéines de la superfamille Snail des vertébrés ainsi que celle de la famille Scratch chez les invertébrés répriment l'expression des gènes grâce au domaine SNAG présent à l'extrémité amine (Fig.24B). Ce domaine



interagit directement avec des complexes promouvant la déacétylation des histones (HDAC1 et HDAC2, Peinado et al., 2004), modifiant la compaction de la chromatine et ainsi inhibant l'expression des gènes.

Les protéines de la famille Snail des invertébrés ne possèdent pas de domaines SNAG. Dans ce cas, la répression de l'expression des gènes cibles est assurée par la liaison avec des corépresseurs tel que la protéine C-terminal Binding Protein (CtBP, Nibu et al., 1998 ; Nieto, 2002) (Fig.24B). Le mode d'action de CtBP reste encore mal connu mais il induit, directement ou indirectement, une modification des histones (Nibu et al., 1998). Chez la drosophile, la protéine Snail a un autre corépresseur nommé Ebi. Ebi permettrait le recrutement d'histones déacéthylases (HDAC3) en agissant en synergie avec CtBP (Qi et al., 2008). Cependant des données plus récentes montrent qu'ils peuvent agir autrement qu'en modifiant la compaction de la chromatine. En effet Snail serait capable d'interagir avec l'ARN polymérase II, bloquant sa progression et ainsi inhibant la transcription des gènes cibles (Bothma et al., 2011). De plus, Snail serait capable de réguler l'expression des gènes sur de longues distances en bloquant par la formation de boucles chromatinienne, un processus souvent impliqué dans le rapprochement entre une séquence codante et un promoteur distant (Chopra et al., 2012).

Toutefois, ce rôle de répresseur entre souvent en contradiction avec des observations faites lors de l'analyse de mutants pour les membres de cette famille. Par exemple, l'expression de gènes tels que Myocyte-enhancing factor 2, Zn finger homeodomain 1 et Tinman est diminuée dans des embryons mutants *snail* de drosophile (Lilly et al., 1994 ; Casal and Leptin, 1996 ; Ip et al. 1994). Au moment de ces analyses, Snail était considéré comme ayant uniquement un rôle de répresseur. L'hypothèse pour expliquer la diminution de l'expression des gènes cités ci-dessus est que Snail inhiberait la production d'un répresseur de l'expression de ces gènes. Ainsi, dans des conditions de perte de fonction *snail*, le répresseur serait produit et l'expression des gènes éteinte ou diminuée. Mais une hypothèse alternative qui a commencé à s'installer suite à ces données est que Snail pourrait également être un activateur de l'expression des gènes. Récemment il a été montré que le répresseur transcriptionnel Ces-1, un membre de la famille Scratch chez *C. elegans*, active la transcription de gènes rapporteurs et que cette activation est dépendante de la fixation de Ces-1 sur l'ADN et du type cellulaire (Reece-Hoyes et al., 2009). Ce rôle activateur a également été mis en évidence chez la souris, la



caille et très récemment chez la drosophile (Tao et al. 2011 ; Sakai et al. 2006 ; Rembold et al., 2014). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la transition entre la fonction activatrice et la fonction répressive restent toutefois inconnus. Cependant l'étude chez la drosophile indique que Snail peut, dans une même cellule, agir comme activateur et un répresseur excluant la possibilité que ce rôle dépende du contexte cellulaire. Cette étude montre que la décision d'agir comme un activateur ou un répresseur reposerait sur d'autres facteurs de transcription se fixant à proximité de Snail (Rembold et al., 2014).

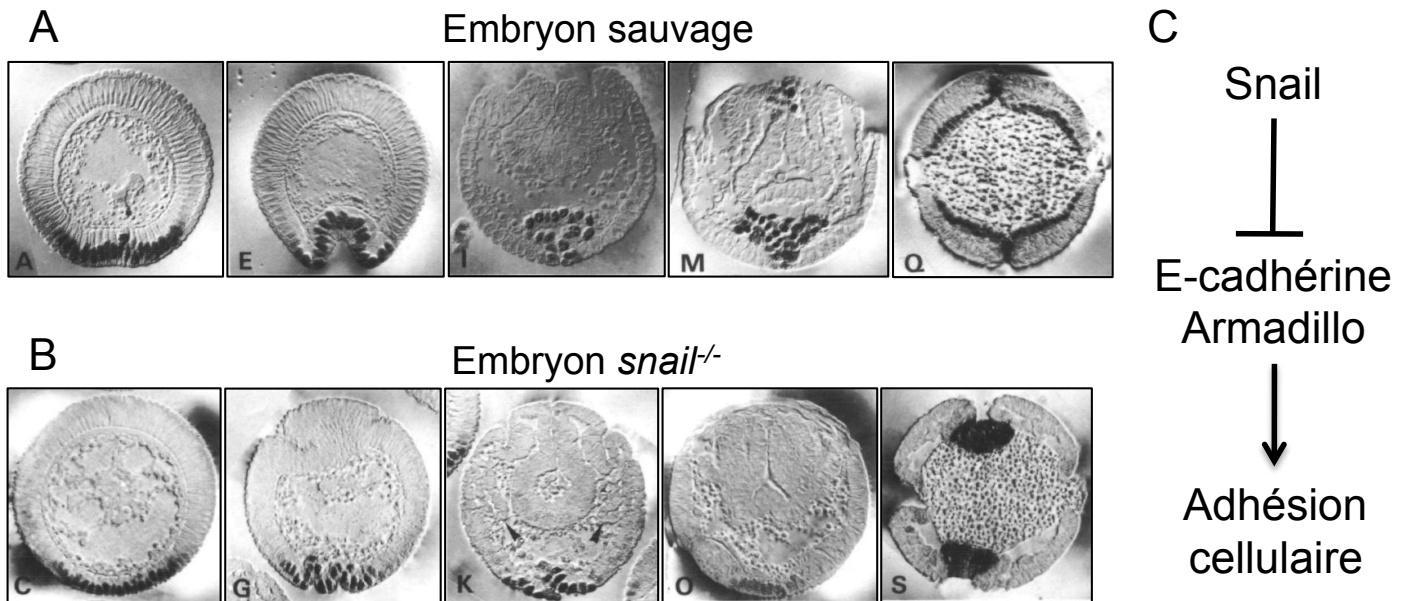
#### (1) *Famille Scratch*

Les protéines de la famille Scratch sont caractérisées par la présence au niveau de l'extrémité amine d'une séquence très conservée appelée Scratch. Ce domaine n'a pas de fonction particulière mais il sert de critère d'appartenance à la famille (Fig.24B).

Cette famille a récemment été révélée lors de l'identification de nouveaux gènes apparentés aux facteurs Snail. Dans un premier temps, les gènes *scratch* chez la drosophile (Roark et al., 1995) et *cell death specification 1 (ces-1)* chez le nématode (Metzstein et Horvitz, 1999) ont été identifiés via leur rôle respectivement dans la neurogenèse et dans l'apoptose. Par la suite, une analyse informatique a permis de mettre à jour de nouveaux gènes appartenant à la famille Scratch chez le nématode, la drosophile, le poisson zèbre, la souris et l'homme. Cette analyse a montré que ces facteurs sont plus fortement similaires à Scratch (drosophile) et Ces-1 (nématode) qu'aux gènes de la famille Snail (Manzanares et al., 2001). Il est à noter que le facteur Ces-1 présente le plus faible taux de conservation au sein de la superfamille Snail.

#### (2) *Famille Snail/Slug*

La famille Snail/Slug est caractérisée par la présence de domaines de liaison à l'ADN de type doigt de zinc très conservés et une absence de domaine Scratch. Chez la drosophile, la famille Snail est composée de trois membres : *snail (sna)*, *escargot (esg)* et *worniu (wor)*. Du fait de leur forte homologie de séquence (76 à 85%), ces trois protéines peuvent se fixer sur les mêmes séquences nucléotidiques. Ainsi ces trois facteurs ont une redondance fonctionnelle lors de la formation des neuroblastes embryonnaires. Chez les vertébrés, les membres de la famille Snail sont un peu plus divergents, formant ainsi deux sous-familles : Snail et Slug (revue par Hemavathy et al., 2000). Les membres de la sous-famille Slug, caractérisés par la présence d'une séquence



**Figure 25 : Les embryons mutant pour le gène *snail* présentent un défaut de gastrulation**

(A-B) Gastrulation d'embryons contrôle (A) et mutant *snail* (B) dont les cellules mésodermique ont été identifiées avec un immunomarquage contre Twist. Noter que dans l'embryon mutant *snail*, les cellules mésodermiques échouent à s'invaginer. Photographies extraites de Leptin et Grunewald, 1990 (C) Schéma représentant l'implication de Snail dans la migration des cellules mésodermiques. En inhibant la production de molécules d'adhésion comme la E-cadhérine et Armadillo, Snail provoque la désolidarisation des cellules entre elles et leur migration.

spécifique (domaine Slug), sont extrêmement conservés au sein des Vertébrés (90% d'homologie) (Fig.24B).

## **2. Processus cellulaires régulés par la superfamille Snail**

### **(1) *Morphogenèse et migration cellulaire***

L'implication des facteurs Snail dans la morphogenèse et la migration cellulaire est un sujet extensivement étudié tant pour ses répercussions développementales que pathologiques. Le nombre d'études et les données sur le sujet étant très vastes, je vais synthétiser ici les principaux éléments apportés par ces recherches.

#### **a. Gastrulation de l'embryon**

La perte de fonction *snail* dans l'embryon de drosophile provoque un défaut de gastrulation (Grau et al., 1984 ; Leptin et Grunewald, 1990) (Fig.25A). Or un processus clé de la gastrulation est la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT). C'est l'étape initiatrice de la migration cellulaire. Elle correspond à de profonds changements morphologiques des cellules épithéliales : modification de l'adhésion avec la matrice extracellulaire et perte d'adhésion des cellules entre elles. Lors de la gastrulation de l'embryon, par le biais de ces modifications d'adhésion, les cellules mésodermiques les plus ventrales s'aplatissent et se contractent au niveau apical (c'est à dire le côté de la cellule dirigé vers l'extérieur de l'embryon). Ce changement de forme provoque un creusement du mésoderme, formant le sillon ventral. L'invagination se poursuit jusqu'à ce que tout le mésoderme soit internalisé (Leptin, 1999). Avant la gastrulation, *snail* est exprimé dans une bande de cellules ventrales de l'embryon de drosophile. Il contribue à la gastrulation en réprimant l'expression de molécules impliquées dans l'adhésion comme la E-cadherine ou Armadillo, permettant la désolidarisation des cellules entre elles et leur migration vers l'intérieur de l'embryon (Oda et al., 1998 ; Cano et al., 2000 ; Battle et al., 2000 ; Kölsch et al., 2007) (Fig.25B). Ainsi, le facteur Snail est un initiateur de l'EMT à l'origine de l'invagination des cellules mésodermiques dans l'embryon de drosophile. De plus, ce rôle ne se limite pas à la gastrulation des invertébrés et a été montré comme conservé chez tous les Triploblastiques (Carver et al., 2001.)

#### **b. Migration des crêtes neurales**

L'EMT est un processus de morphogenèse cellulaire utilisé de manière itérative tout au long du développement et ne se restreint pas à la gastrulation. Ainsi, afin de





former le système nerveux périphérique, des cellules pigmentaires et des structures faciales osseuses, les cellules à la frontière entre la plaque neurale et l'épiderme, appelées cellules des crêtes neurales, délaminent à l'intérieur de l'embryon et migrent dans l'ensemble du corps (Serbedzija et al., 1989). Comme lors de la gastrulation, l'initiation de cette migration nécessite un remodelage entier des jonctions cellulaires, permettant l'EMT. Là encore les membres de la famille Snail sont impliqués.

En effet, Slug chez le poulet et le xénope et Snail chez la souris sont exprimés dans les cellules des crêtes neurales. Une perte de fonction *slug* chez le poulet et le xénope provoque une absence de migration de ces cellules (Nieto et al., 1994 ; LaBonne et Bronner-Fraser, 2000), indiquant une conservation du rôle des facteurs Snail dans l'initiation de l'EMT. Toutefois il est à noter que si des souris mutantes *snail* meurent à la suite de défauts lors de la gastrulation (Carver et al., 2001), une perte de fonction conditionnelle de gène uniquement dans les cellules de la crête neurale ne provoque pas d'absence de migration de celles-ci (Murray et Gridley, 2006). Toutefois Snail serait requis, de manière redondante avec Slug (aussi appelé Snail2), chez la souris pour la fermeture de la fente palatine, un autre processus développemental requérant l'EMT (Murray et al., 2007).

Pour résumer, les facteurs de la famille Snail sont des facteurs d'initiation de l'EMT dans divers processus développementaux. En réprimant la production de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire comme la E-cadherine ou Armadillo, ils induisent la désolidarisation des cellules entre elles et augmentent ainsi leur motilité.

#### c. Migration des neurones lors de la formation du cortex de la souris

La capacité d'initiateur de l'EMT n'est pas limitée à la famille Snail mais à toute la superfamille. En effet, les facteurs Scratch1 et Scratch2 sont exprimés dans les neurones et les progéniteurs neuronaux du cortex de la souris. Comme nous l'avons vu précédemment, les NSCs produisent séquentiellement les différents types de neurones et ceux-ci s'organisent en couches avec les neurones les plus anciens localisés dans la partie interne alors que les plus récents migrent dans la couche la plus superficielle. Or une diminution des niveaux de Scratch1/2 conduit à une absence de migration de ces cellules, corrélée à une diminution du niveau de E-cadhérine (Itoh et al., 2013).

Les protéines de la famille Scratch sont donc également capables d'initier l'EMT et ceci en agissant sur les mêmes cibles transcriptionnelles que les protéines de la famille



Snail, indiquant une forte conservation et une redondance fonctionnelle au sein de la superfamille Snail.

#### d. Capacités métastatiques des cellules cancéreuses

L'EMT n'est pas qu'un processus développemental. Il est également requis dans les étapes initiatrices de la phase métastatique des cellules cancéreuses. Or il a été fréquemment observé que Snail est exprimé dans des cellules provenant de tumeurs invasives alors que cette expression n'est pas retrouvée dans des tumeurs non-invasives (Cano et al., 2000). De plus, dans les cellules cancéreuses invasives, l'expression de Snail est corrélée à une diminution de la E-cadhérine (Cano et al., 2000 ; Battle et al., 2000). De même pour Slug, sa présence est corrélée à un remodelage des jonctions cellulaires dans des cellules de carcinome de rat (Savagner et al., 1997). Il n'est donc pas étonnant d'observer que la récurrence des tumeurs est fréquemment associée à une activation de ces facteurs (Montserrat et al., 2011).

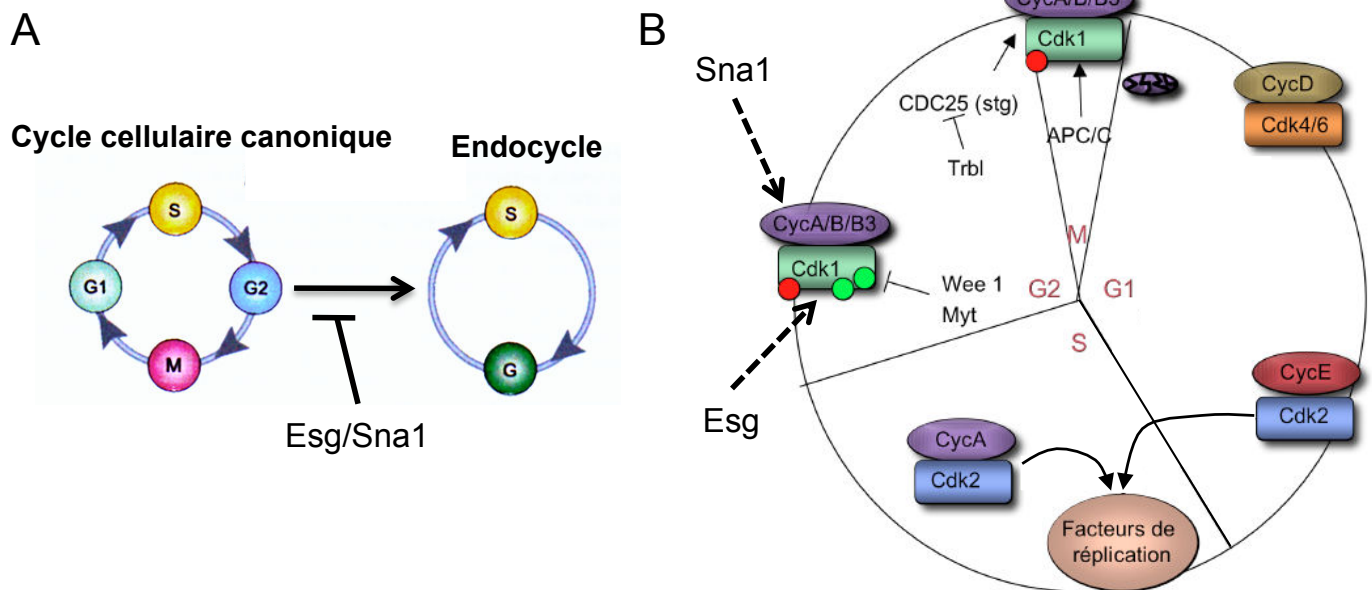
L'initiation de l'EMT est un des processus contrôlés par les facteurs de la superfamille Snail le plus étudié. Cependant, ces facteurs sont aussi impliqués dans de nombreux autres processus cellulaires du développement.

#### (2) *Maintien de l'identité précurseur*

Les facteurs de la famille Snail jouent également un rôle dans le maintien des capacités prolifératives des cellules. Ils agissent soit directement en régulant les gènes impliqués dans l'identité des cellules précurseurs soit indirectement en contrôlant la progression du cycle cellulaire.

##### a. Mise en place de l'identité mésodermique et inhibition de la division lors de la migration cellulaire.

La protéine Snail a trois rôles différents lors de la gastrulation : (1) la spécification des cellules mésodermiques, d'une part en inhibant l'expression des gènes neuroectodermiques (Kosman et al., 1991 ; Ip et al., 1992 ; Kasai et al., 1992) et d'autre part en activant l'expression de gènes mésodermiques (Rembold et al., 2014). Ainsi dans les embryons mutants pour le gène *snail*, il y a une disparition de l'identité mésodermique au profit de l'identité neuroectodermique ; (2) l'initiation de la migration cellulaire des cellules mésodermiques comme vu précédemment et (3) l'inhibition des



**Figure 26 : Les facteurs Snail inhibent l'entrée en endocycle pour maintenir un état précurseur**

(A) Comparaison du cycle cellulaire canonique et de l'endocycle. Le cycle cellulaire canonique est composé de quatre phases : deux phases de croissance (G1/G2), une phase de réplication de l'ADN (S) et une phase de mitose (M). Un endocycle est composé uniquement de phase de réplication de l'ADN et d'une phase de croissance. Esg et Snail bloquent la transition de cycle canonique vers endocycle. (B) Représentation du mécanisme d'inhibition de la transition cycle canonique/endocycle par Esg et Snail. Dans les histoblastes de la drosophile, Esg maintiendrait un haut niveau de la kinase mitotique Cdk1, inhibant ainsi l'entrée en phase S des cellules quiescentes. Dans les trophoblastes murins, Snail augmenterait le niveau de Cycline A et cette augmentation bloquerait l'entrée dans une nouvelle phase de réplication.

divisions lors de la migration des cellules. En effet, lors de la gastrulation les cellules mésodermiques en cours de migration sont mitotiquement inactives et forcer la division de ces cellules perturbe fortement leur migration (Edgar et al., 1993 ;Seher et Leptin, 2000). Or une perte de fonction *snail* induit une augmentation de la fréquence de division de ces cellules (Grosshans et Wieschaus, 2000). Les auteurs émettent l'hypothèse que Snail activerait la fonction de Tribbles, un facteur impliqué dans le blocage de la transition G2/mitose, exprimé dans les cellules mésodermiques. Ceci conduit à une inhibition de la division des cellules en cours de migration.

Pour conclure, les facteurs Snail servent de lien entre la mise en place de l'identité mésodermique et la migration de ces cellules, assurant ainsi que la gastrulation se déroule harmonieusement.

#### b. Maintien de la diploïdie dans les cellules précurseurs

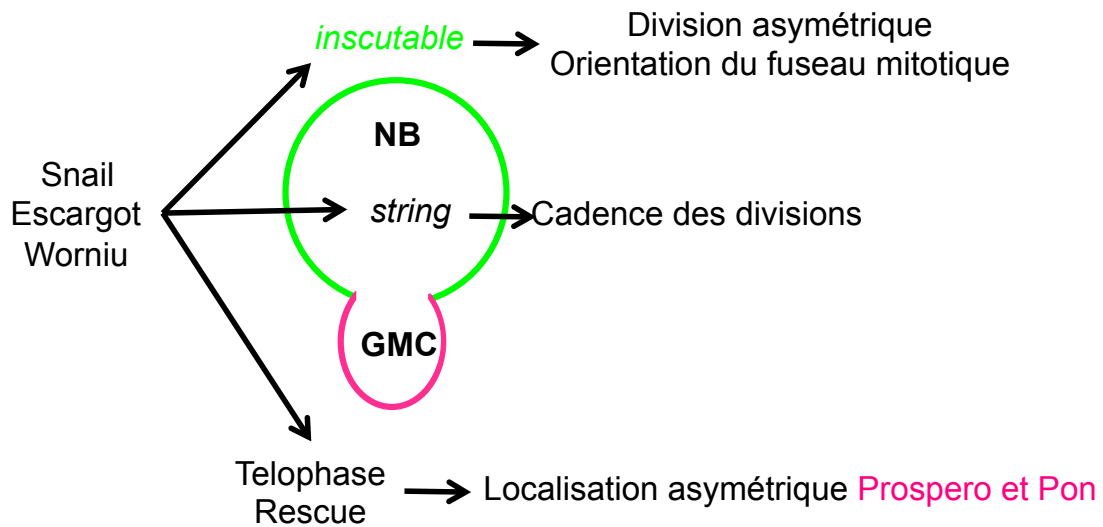
Le rôle des facteurs Snail dans la régulation de la division cellulaire ne se résume pas à inhiber la mitose dans des cellules en cours de migration. Ils contrôlent également la progression du cycle cellulaire dans des cellules ne réalisant pas l'EMT, permettant ainsi le maintien de l'identité précurseur.

En effet, Escargot (Esg) chez la drosophile et Snail chez la souris ont tous deux été montrés comme inhibant l'endoréplication (une division où la mitose est absente et où seules les phases de réplication de l'ADN et de croissance cellulaire sont présentes) respectivement dans les cellules précurseurs à l'origine de l'abdomen (histoblastes) et les cellules impliquées dans la formation du placenta (cellules trophoblastiques) (Fuse et al., 1994 ; Hayashi, 1996 ; Nakayama et al., 1998) (Fig.26A). Esg et Snail maintiendraient ces cellules à l'état diploïde en régulant des facteurs impliqués dans l'inhibition de l'entrée en mitose (tel que la kinase dépendante des cyclines CDK1 dans les histoblastes et les cyclines A et B dans le trophoblaste) (Fig.26B). Le blocage d'une nouvelle phase de réplication empêche ces cellules de devenir polyploïdes et donc de perdre leurs capacités prolifératives (Hayashi, 1996 ; Nakayama et al., 1998).

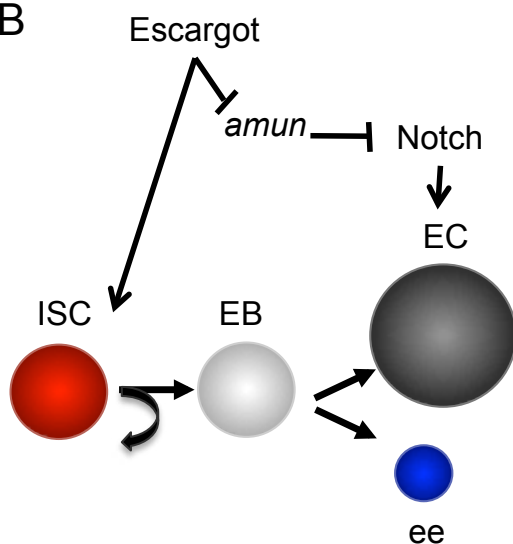
#### c. Régulation de la division et maintien de l'identité des cellules souches neurales, intestinales et germinales

Toutefois le maintien de l'identité précurseur par les facteurs Snail ne se limite pas à un maintien de la diploïdie. En effet dans les cellules souches neurales (neuroblastes), intestinales et germinales chez la drosophile, au moins un des membres de la

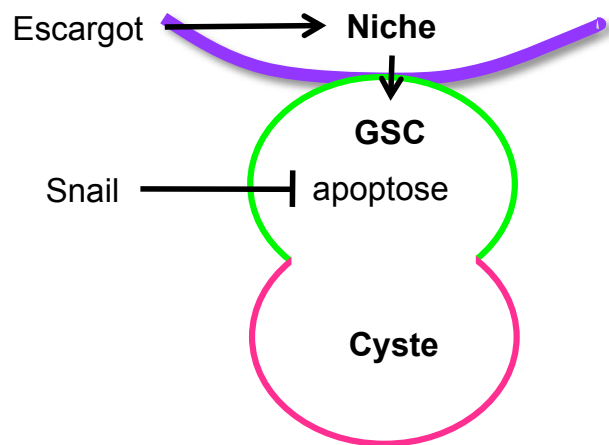
A



B



C



**Figure 27 : Implication des facteurs Snail dans les cellules souches de la drosophile**

(A) Neuroblastes embryonnaires : *esg*, *snail*, et *wor* contrôlent de manière redondante l'asymétrie de la division via *Inscutable* et la télophase rescue ainsi que la cadence des divisions via la phosphatase activatrice de l'entrée en mitose *String*. NB, neuroblaste ; GMC, cellule mère ganglionnaire ; Pon, Partner of Numb (B) Cellules souches intestinales : *Esg* permettrait le maintien de l'identité souche et influencerait la décision de l'entéroblaste lors de sa différenciation en entérocyte ou cellule sécrétrice. ISC, cellule souche intestinale ; EB, entéroblaste ; EC, entérocyte ; ee, cellule sécrétrice. (C) Cellules souches germinales mâles : *Esg* permettrait le maintien des cellules de la niche alors que *Snail* préviendrait l'apoptose dans la cellule souche. GSC, cellule souche germinale.

superfamille Snail joue directement un rôle dans la mise en place de l'identité précurseur.

Dans les neuroblastes, les trois membres de la famille Snail (Esg, Snail et Wor) sont exprimés. Une délétion couvrant ces trois gènes provoque : (i) de sévères défauts lors de la formation du système nerveux central de l'embryon et (ii) une forte diminution de l'expression de facteurs contrôlant l'asymétrie des divisions et le cycle cellulaire (respectivement Inscutable et String) (Ashraf et al., 1999). Ainsi la prolifération et l'asymétrie des divisions sont affectées. Par exemple des déterminants cellulaires, tel que Prospero (Pros) et Partner of Numb (Pon), ne sont plus ségrégés uniquement dans la GMC (Ashraf et al., 2001). Or, dans les embryons portant une mutation perturbant l'asymétrie des divisions (comme lors de la perte de fonction *inscutable*), le défaut de ségrégation des déterminants cellulaires n'est visible que lors des premières étapes de la division (prophase). Avant la dernière phase de la mitose (la télophase), ces facteurs se réalignent avec le fuseau mitotique et sont correctement ségrégés dans la GMC. Ce phénomène, appelé la télophase rescue, n'est plus effectif dans les neuroblastes triple mutants *snail*, *esg* et *wor* (Cai et al., 2001). Ainsi, dans les neuroblastes, les facteurs de la famille Snail contribuent à la division en régulant : (1) d'une part la cadence du cycle via l'expression de *string*, un facteur promouvant la transition G2/mitose et (2) d'autre part l'asymétrie des divisions en activant l'expression d'*inscutable* et en participant au mécanisme de télophase rescue (Fig.27A).

Concernant les cellules souches intestinales, Esg est exprimé dans l'ISC et sa cellule fille l'entéroblaste (EB, voir introduction chapitre II.2.3 pour le lignage des ISCs). Ce facteur est d'ailleurs couramment utilisé comme marqueur de ces types cellulaires. Ensuite cette expression n'est pas maintenue lors de la spécification de l'EB en cellule sécrétrice (ee) ou entérocyte (EC) (Micchelli et Perrimon, 2006 ; Streit et al., 2002). L'implication d'Esg dans ces cellules est longtemps restée non élucidée. Cependant des données récentes tendent à indiquer qu'Esg serait impliquée dans le maintien de l'identité de l'ISC et dans la décision de l'EB pour le destin ee versus EC (données provenant d'un poster au congrès annuel américain de la drosophile 2014, présenté par Mariano Loza-Coll, laboratoire de Leanne Jones) (Fig.27B).

Le facteur Esg est également exprimé dans les gonades mâles de la drosophile (cellules somatiques et les cellules souches germinales (GSCs) mâles). Cependant une perte de fonction *esg* spécifiquement dans les GSC n'induit pas de défaut dans leur





maintien. Esg semble être requis dans les cellules somatiques entourant les GSCs pour maintenir les cellules de la niche et par conséquent le maintien des GSCs (Streit et al., 2002 ; Voog et al., 2008). En effet, des données plus récentes indiquent qu'Esg préviendrait la transformation des cellules de la niche en cellules souches (Voog et al., 2014). Un autre membre de cette famille, le facteur Snail est exprimé dans les GSCs mais à plus faible niveau comparé à l'expression d'Esg. Des données récentes indiquent que Snail serait impliqué dans l'inhibition de l'apoptose dans ces cellules (données provenant d'un poster au congrès annuel américain de la drosophile 2014, présenté par Gary Hime) (Fig.27C).

Les facteurs de la famille Snail sont donc intrinsèquement liés à la mise en place de l'identité dans les cellules souches chez la drosophile. Ce rôle semble être conservé chez les vertébrés puisque une perte de fonction *slug* (*snail2*) chez la souris provoque des défauts lors de la spermatogenèse (données provenant d'un poster au congrès annuel américain de la drosophile 2014, présenté par Gary Hime).

### (3) *Mise en place de l'identité neurale et neuronale*

Chez la drosophile, les membres de la superfamille Snail sont impliqués dans le développement du système nerveux, et plus particulièrement dans la mise en place de l'identité neurale. Les quatre gènes *snail*, *esg*, *wor* et *scrt* sont exprimés dans de nombreux types de précurseurs neuraux et de cellules neuronales. Dans cette section je vous présente un résumé des principales études sur le sujet.

#### a. *Scratch et le système nerveux périphérique embryonnaire*

La protéine Scrt est le premier facteur de la superfamille Snail ayant été montré comme étant impliqué dans la mise en place de l'identité neuronale (Roark et al., 1995). Dans cette étude, les auteurs montrent que la perte de fonction individuelle *scrt* n'induit pas de défauts importants dans le système nerveux. Cependant la combinaison de la perte de fonction *scrt*, avec une perte de fonction du gène proneural *deadpan* (*dpn*), provoque la disparition de neurones dans le système nerveux périphérique de l'embryon, une mauvaise arborisation des neurones restants et enfin des défauts dans les connections des neurones du système nerveux central.

Ainsi Scrt, en synergie avec d'autres facteurs, promeut la mise en place de l'identité neurale et contrôle la différenciation neuronale (Roark et al., 1995).



#### b. Worniu et les neuroblastes larvaires

La perte de fonction *wor* ne se traduit pas par une altération drastique des divisions et du lignage final des neuroblastes de la larve. Seule la taille et la morphologie du cerveau sont légèrement affectées (Ashraf et al., 2004 ; Lai et al., 2012). Néanmoins, une analyse du transcriptome de neuroblastes larvaires a pu mettre en évidence que la perte de fonction de ce gène est loin d'être anodine. En effet, la perte de fonction *wor* affecte l'expression de nombreux gènes, particulièrement ceux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation neuronale : d'une part une diminution de l'expression de facteurs promouvant l'identité et la division des neuroblastes et d'autre part une augmentation des facteurs de différenciation neuronale tel que Embryonic lethal abnormal vision (Elav) (Lai et al., 2012).

Ainsi Wor participe au maintien du caractère indifférencié des neuroblastes et empêche leur différenciation prématurée en neurones. Ces modifications des capacités d'autorenouvellement des neuroblastes pourraient être à l'origine de la diminution de taille du cerveau de la larve observée lors d'une perte de fonction *wor*.

#### c. Escargot et les neurones chemosensoriels chez l'adulte

Si Wor semble requis pour le maintien des neuroblastes, Esg au contraire semble favoriser la différenciation neuronale. Dans les organes chémorécepteurs sensibles au CO<sub>2</sub> de la mouche adulte, deux neurones (exprimant *esg* et *nervous finger 1*) et une cellule gaine (exprimant *prospero*) sont formés. Dans ce système, la perte de fonction du facteur de transcription Pros ou du microARN miR-279 provoque une augmentation du nombre de neurones et une absence de cellule gaine. Dans ce contexte, une diminution de dose Esg ou Nerfin-1 diminue le nombre de neurones ectopiques, autrement dit la fréquence de transformation d'identité. Réciproquement, la surexpression conjointe d'Esg et Nerfin-1 induit l'apparition de neurones ectopiques.

Les auteurs proposent donc qu'Esg, conjointement avec Nerfin-1, promeuvent l'identité neuronale dans ce lignage. Leur répression par Pros et miR-279 permettrait la mise en place de l'identité gaine (Hartl et al., 2011).

#### d. Redondance de la famille Snail dans les neuroblastes embryonnaires

Comme je l'ai mentionné plus haut, une délétion couvrant les trois gènes de la famille Snail provoque une altération de ségrégation asymétrique de facteurs impliqués dans la différenciation neurale comme Pros et Pon (Cai et al., 2001). Or ces défauts de



mise en place de l'identité neurale ne sont pas observés lors de la perte de fonction d'un seul de ces facteurs. De même les phénotypes observés dans des embryons triples mutants sont sauvés si un seul de ces facteurs est surexprimé (Ashraf et al., 2001). Ces données montrent que, du fait de la forte conservation entre ces facteurs, ceux-ci peuvent agir de manière redondante, notamment lors de la formation du système nerveux central. Il est à noter que cette redondance n'a pour l'instant été montrée que dans le cadre de la mise en place de l'identité neurale puisque dans le cas de l'identité mésodermique, Snail ne peut pas être remplacé par Esg ou Wor lorsqu'on les exprime dans les cellules mésodermiques dans des embryons mutant *snail* (Hemavathy et al., 2004).

#### e. Slug et Esg : conservation du rôle de promoteur de l'identité neurale

L'implication des membres de la superfamille Snail dans la mise en place de l'identité neurale et neuronale n'est pas restreinte à la drosophile. La surexpression de Slug dans des précurseurs neuraux de mammifères en culture promeut leur différenciation en neurones et l'expression des marqueurs d'identité neuronale tel que Neu N. Ce qui est plus surprenant est que la surexpression d'Esg dans ces cellules a exactement le même effet que Slug, indiquant que la machinerie régulée par les facteurs Snail et impliquée dans la différenciation neuronale est fortement conservée au sein des eucaryotes (Yang et al., 2010).

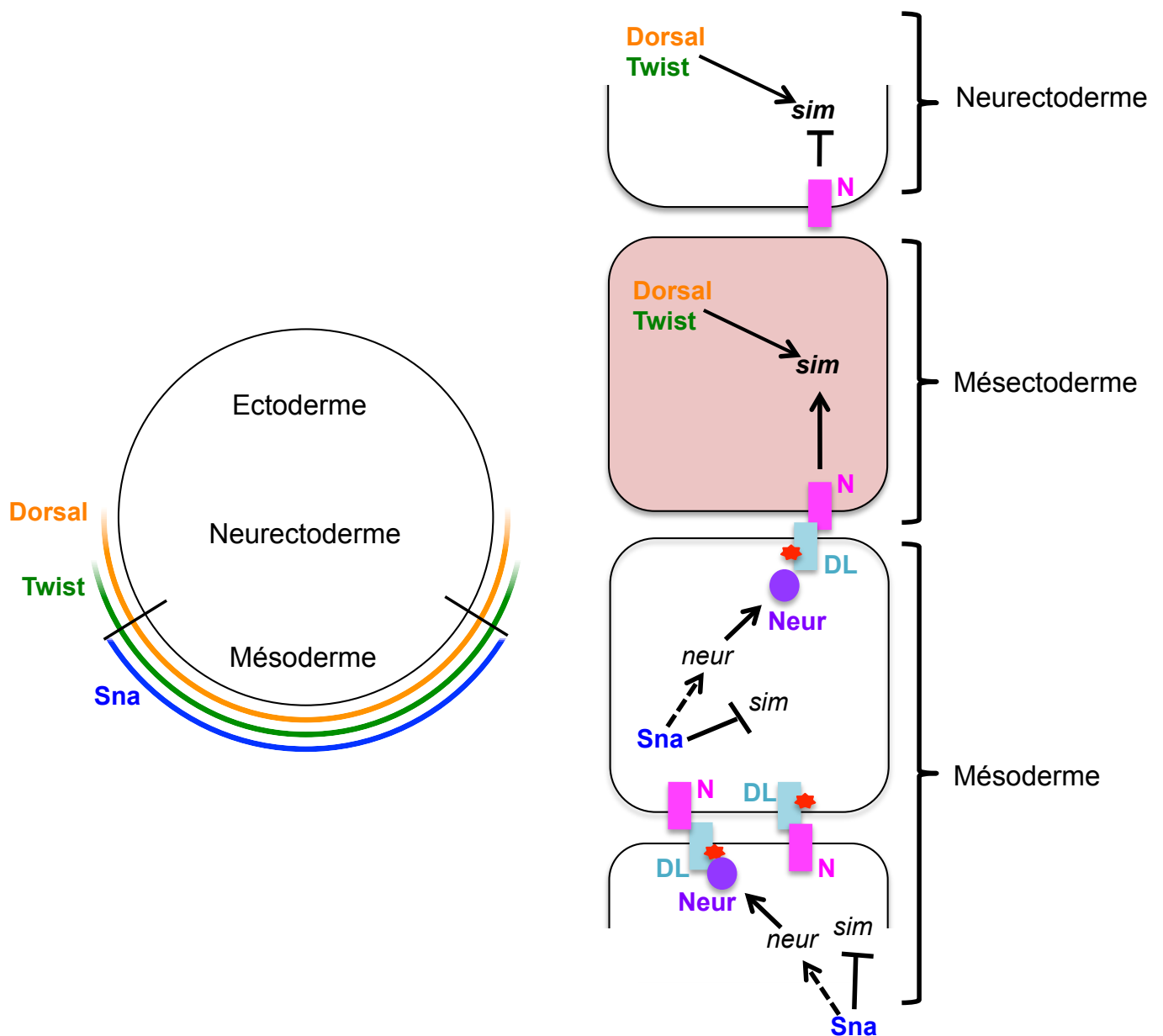
Pour conclure, que ce soit individuellement ou collectivement, les membres de la superfamille Snail contribuent à la différenciation neurale et neuronale dans une grande variété de précurseurs neuraux et de cellules neuronales.

### **3. Interaction des facteurs Snail et de la voie Notch**

Comme nous venons de le voir, la voie de signalisation Notch et les protéines de la superfamille Snail sont des facteurs clés de la détermination cellulaire (entre autre) tout au long du développement. Or, un nombre croissant d'étude montre que ces deux facteurs interagissent, que ce soit en collaboration ou en compétition, dans divers systèmes.

#### (1) *Régulation de Delta par Snail*

Dans l'embryon de drosophile, à la frontière entre mésoderme et ectoderme se trouve une région composée de quelques rangées de cellules appelée méssectoderme. Le



**Figure 28 : Recyclage du ligand de Notch par Snail dans l'embryon de drosophile**

(A-B) Schémas représentant la formation du méssectoderme dans l'embryon de drosophile. (A) Section d'un embryon de stade 5 (après cellularisation) où l'expression de *snail* (bleu), *twist* (vert) et *dorsal* (orange) est schématisée. La région ventrale est vers le bas et la région dorsale vers le haut. (B) Schéma du réseau d'interaction contrôlant la mise en place du méssectoderme. Haut: Dans les cellules les plus dorsales, Twist (vert) et Dorsal (orange) favorisent l'expression de *single minded* (*sim*) mais en absence d'activation du récepteur Notch (rose), l'expression du gène reste réprimée. Ces cellules acquièrent l'identité neurectodermique. Bas: Dans les cellules ventrales, Snail (bleu foncé) réprime l'expression de *single minded* (*sim*) et active celle de *neuralized* (*neur*). Neur favorise l'endocytose de Delta (bleu clair) et son interaction avec Notch. La voie Notch est activé dans les cellules ventrales mais la présence de Snail réprime l'expression de *sim*. Ces cellules acquièrent l'identité mésodermique. Milieu: Seules les cellules à la frontière de la zone d'expression de Snail peuvent interagir avec un forme de Delta activé (étoile) et promouvoir l'expression de *sim* car Snail est absent. Ces cellules acquièrent l'identité méssectodermique.

mésoderme et le mésectoderme forme ce qu'on appelle la bandelette germinative qui participe au processus d'extension et de rétraction de l'embryon. La formation du mésectoderme, caractérisée notamment par l'expression du gène *single minded (sim)*, est la résultante d'une interaction entre la protéine Snail et de la voie Notch.

Le facteur de transcription Dorsal, présent dans les cellules ventrales de l'embryon, active l'expression *twist* et *snail*. Cependant ces deux gènes n'ont pas une expression complètement chevauchante : *snail* est exprimé uniquement dans les cellules les plus ventrales alors que *twist* s'étend plus latéralement (Fig.28, gauche). Alors que Dorsal et Twist activent l'expression des gènes neurectodermique et notamment le gène *sim*, au contraire Snail réprime leur expression, spécifiant ainsi l'identité mésodermique (Kosman et al., 1991 ; Ip et al., 1992 ; Kasai et al., 1992). Or la transplantation de cellules mésodermiques (donc exprimant *snail*) dans la région neurectodermale conduit à l'expression de *sim* dans les cellules autour de l'implantation (Leptin et Roth, 1994). L'expression de *sim* est donc non-autonome cellulaire et dépend de la confrontation entre cellules mésodermiques et neurectodermiques. De même cela indique que l'expression de *sim* est réprimée dans les cellules loin de la frontière.

La perte de fonction Su(H) conduit à une diminution de l'expression de *sim* dans le mésectoderme et à une expansion de cette expression dans la région neurectodermale où elle est normalement réprimée. De plus une activation ectopique de Notch dans les cellules neurectodermales conduit à la levée de la répression de l'expression de *sim* (Morel et Schweisguth, 2000). Ainsi, la voie Notch est impliquée dans l'activation de l'expression de *sim* dans le mésectoderme (où le signal Notch est activé) et à sa répression dans le neurectoderme (où le signal Notch n'est pas activé). La voie Notch est donc spécifiquement activée à la frontière entre les cellules mésodermiques et neurectodermiques, rappelant le cas de la frontière dorso-ventrale du disque d'aile.

De manière intéressante, Snail est impliqué dans l'activation de Notch dans les cellules mésectodermiques adjacentes. En effet, via la régulation de Neuralized, Snail promeut l'endocytose du ligand Delta dans les cellules mésodermiques (Morel et al., 2003) (Fig.28B). Or le trafic intracellulaire des ligands est essentiel pour leur activation et leur liaison avec le récepteur. Donc Snail est capable de moduler l'émission du signal Notch requis pour la formation du mésectoderme.

Ainsi Snail participe à la mise en place de l'identité mésectodermique en régulant les ligands du récepteur Notch.





## (2) *Interaction physique de Notch et Snail*

Dans les cellules cancéreuses, l'expression de Snail et l'activation de la voie Notch sont fréquemment dérégulées. Néanmoins, dans les cellules d'hépatocarcinome, les variations d'activité de Notch et d'expression de Snail sont corrélées. Ainsi une activation ectopique de Notch provoque une diminution de Snail et des capacités métastatiques des cellules. Réciproquement, la déplétion de Notch cause une forte augmentation de Snail et des capacités métastatiques des cellules (Wang et al., 2011). Cette corrélation résulte d'une interaction physique entre Snail et Nintra qui provoque leur inhibition réciproque. D'une part Nintra, en se liant à Snail, recrute des ubiquitine ligases qui vont diriger le complexe Snail/Notch vers la voie de dégradation (Lim et al., 2011). D'autre part Snail empêche la formation du complexe activateur en entrant en compétition avec le co-activateur Mastermind pour sa liaison avec Nintra. Snail empêche donc la réponse transcriptionnelle lors de l'activation du signal Notch (Kim et al., 2013).

Ainsi dans les cellules d'hépatocarcinome, la voie Notch et le facteur Snail sont fondamentalement liés par une interaction physique, qui peut même inhiber leur fonction respective.

## (3) *Régulation de l'expression de Snail par Notch*

Si Snail contrôle l'expression de facteurs impliqués dans l'activation du ligand Delta, Notch réciproquement peut contrôler l'expression des membres de la famille Snail. Lors du développement cardiaque, Slug et Snail contribuent à la migration des cellules de l'enveloppe cardiaque qui sont à l'origine de la formation des valves et septums du cœur adulte. Or l'expression de *slug* est directement activée par Notch dans les cellules endothéliales. Cette activation conduit à l'EMT et à la migration des cellules de l'enveloppe cardiaque (Niessen et al., 2008).

Ainsi que ce soit via une interaction indirecte par action sur les ligands, ou bien via une interaction directe par liaison physique ou régulation transcriptionnelle, les protéines de la famille Snail et la voie Notch s'entremêlent dans une grande variété de types cellulaires.



## V. Projet de thèse

Comme je vous l'ai décrit dans l'introduction, les facteurs de la superfamille Snail ont de multiples fonctions au cours du développement notamment lors de la régulation de l'identité neurale et neuronale. Mon projet de thèse est centré sur l'analyse de l'implication des facteurs de la superfamille Snail dans la mise en place de l'identité cellulaire des soies mécanosensorielles.

Des données préliminaires du laboratoire montrent que la protéine Esg est présente dans pIIb, la cellule précurseur à l'origine du sous lignage neural. Alors que Wor n'est pas détectée dans ces cellules et Snail est présent uniquement dans la cellule gliale (thèse de Pierre Fichelson). En appui de ces observations, l'ARN codant la protéine Esg a été détecté par PCR quantitative dans des cellules pIIb isolées par microdissection laser (données d'Eulalie Buffin). Ainsi Esg est exprimé différemment dans les précurseurs secondaires du lignage des soies. **Quelle est l'expression de ce facteur dans les autres cellules du lignage ? Qu'en est-il de l'expression des membres de la famille Scratch ? Ces facteurs sont-ils impliqués dans l'acquisition de l'identité des cellules des soies mécanosensorielles ?**

Les membres de la famille Snail (Snail, Esg et Wor) agissent de manière redondante lors de la mise en place de l'identité dans les neuroblastes embryonnaires. Seule la délétion des trois gènes entraîne un phénotype qui peut être sauvé par la surexpression d'un seul. **Un tel phénomène est-il retrouvé dans le lignage des soies ? Une redondance est-elle possible entre membres de la superfamille ?**

Les cinq types cellulaires du lignage des soies sont formés à partir d'une cellule précurseur unique après une série de quatre divisions asymétriques. La détermination cellulaire dans ce système repose sur une répétition d'activation différentielle de la voie Notch. **Comment l'utilisation itérative d'un même mécanisme peut-elle conduire à la formation d'une telle diversité cellulaire ? D'autres facteurs, spécifiquement ceux de la superfamille Snail, peuvent-ils être impliqués dans ce processus ? Cette implication se fait-elle en interaction avec la voie Notch ?**

Comme je vous l'ai décrit dans l'introduction, l'implication des facteurs Snail au cours du développement couvre, en plus de la régulation de l'identité cellulaire, une



vaste gamme de processus tels que la morphogenèse cellulaire ou le cycle cellulaire. **Chez la drosophile, les facteurs Snail contrôlent-ils la morphogenèse ou le cycle cellulaire dans le lignage ? Qu'en est-il pour d'autres tissus ?**

Ce sont ces questions qui ont rythmées mes travaux de thèse et auxquelles je vais m'efforcer de répondre en me basant sur les résultats que j'ai obtenus.



# **Matériel et Méthodes**





## I. Lignées de mouches utilisées

Les drosophiles sont élevées et croisées sur un milieu standard (pour 10ml de milieu : 9ml d'eau, 125,5g d'agar, 60g de levure de bière, 960g de farine de maïs et 250ml d'une solution contenant 22% d'antifongique methyl hydroxy-4-benzoate dilué dans de l'éthanol). Sauf cas particulier mentionné au moment de la description de l'expérience, les individus sont gardés à 25°C.

Lignées utilisées comme rapporteur d'expression :

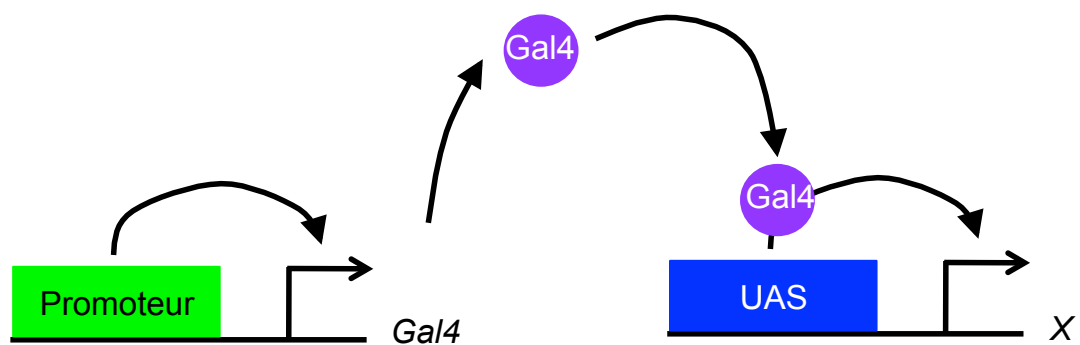
- **Pour *escargot*** : la lignée protein-trap *esg::GFP/Cyo* (FlyTrap) et la lignée enhancer-trap *esg>gal4/Cyo* (don de S. Hayashi)
- **Pour *scratch*** : la lignée enhancer-trap *scrt>lacZ* (chromosome 3)
- **Pour *Notch*** : *GBE+Su(H)<sub>m8</sub>>lacZ* (chromosome 3, Furriols et Bray, 2001)
- **Pour le complexe *E(spl)*** : *E(spl)ma>GFP* (chromosome 2), *E(spl)mβ>lacZ* (chromosome 2), *E(spl)m4>GFP* (chromosome 2), *E(spl)my>lacZ* (chromosome 2) et *E(spl)m8>lacZ* (chromosome 2) (dons de F. Bernard)

Lignées mutantes ou RNAi utilisées :

- **Pour *escargot*** : *esg<sup>G66B</sup> FRT40A/Cyo<sup>TM6Tb</sup>*, *esg<sup>P3</sup>/Cyo<sup>TM6Tb</sup>*, *esg<sup>35ce-1</sup>/Cyo<sup>TM6Tb</sup>* (dons de S. Hayashi) et *UAS>esg dsRNA 9794* (chromosome 3, VDRC)
- **Pour *scratch*** : *scrt<sup>t011</sup>/TM3*, *scrt<sup>t016</sup>/TM3* (dons de E. Biers) et *UAS>scrt dsRNA* (chromosome 2, VDRC)
- **Pour *prospero*** : *pros<sup>17</sup> FRT82B/Cyo<sup>TM6Tb</sup>* (don de C. Doe)
- **Pour *miR-279*** : *miR-279<sup>962-7</sup> FRT82B/TM6Tb* (don de I. Kadow)
- **Pour *Notch*** : *N<sup>ts</sup>* (chromosome X)

Lignées utilisées pour les analyses de gain de fonction :

- **Pour *escargot*** : *UAS>esg* (chromosome 2, don de S. Hayashi)
- **Pour *scratch*** : *HS>scrt* (chromosome 3, don de E. Biers)
- **Pour *miR-279*** : *UAS>miR-279* (don de I. Kadow)
- **Pour *notch*** : *UAS>Nintra* (chromosome 3) et *HS-Nintra* (chromosome 2)
- **Pour *cut*** : *UAS>cut* (chromosome 3, don de N. Perrimon)



**Figure 29 : Le système UAS/Gal4**

Une lignée transgénique contient, en amont du gène codant le facteur de transcription spécifique de la levure Gal4 (violet), les séquences cis-régulatrices d'un gène pilote (vert) choisi pour son expression dans un tissu spécifique. Une seconde lignée transgénique contient les séquences UAS (bleu) en amont de la séquence d'intérêt x. Le croisement de ces deux lignées entraîne l'expression tissu-spécifique du gène x par fixation de Gal4 sur ses séquences cibles UAS.

Lignées utilisées comme source de Gal4 pour les analyses de gain de fonction :

- **Dans le notum** : *neuralized<sup>P72</sup>>Gal4/TM6Tb* et *elav>Gal4* (chromosome 3)
- **Dans le disque d'aile** : *patched>Gal4* (chromosome 2, don de J. Cagliero) ; *engrailed>Gal4* (chromosome 2, don de J. Cagliero)

Lignées utilisées pour les clones de surexpression et clones mitotiques :

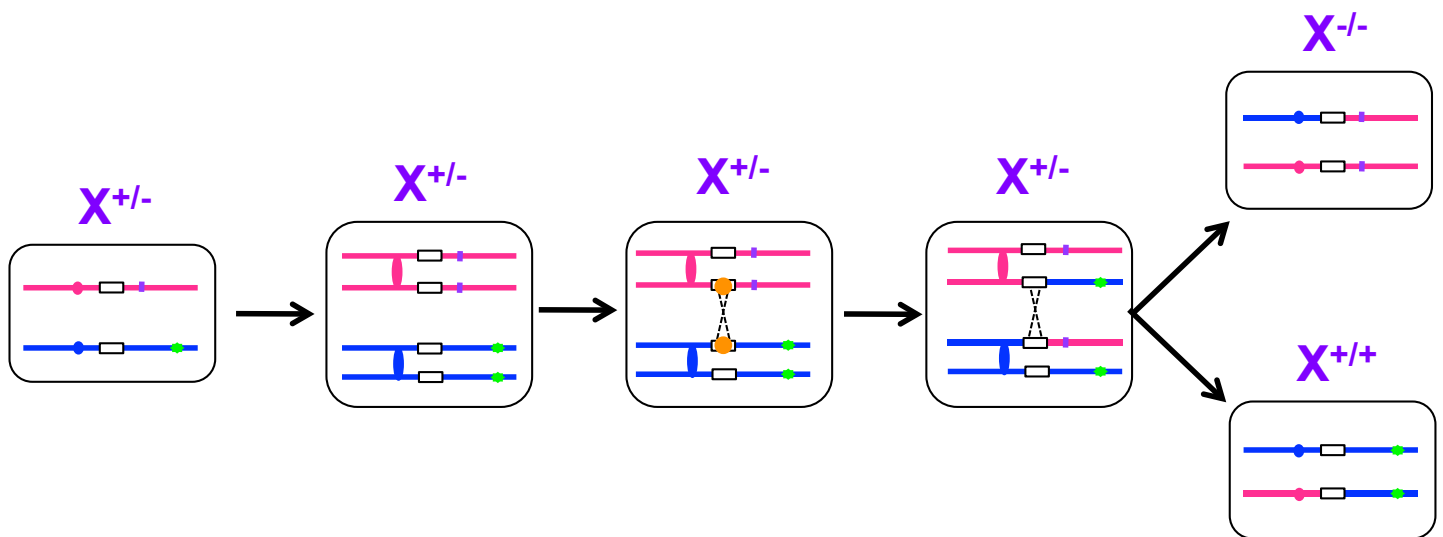
- **Clones de surexpression** : *HS>Flipase ; tubuline>FRT-CD2-FRT-Gal4, UAS>GFP* et *HS>Flipase ; tubuline>FRT-CD2-FRT-Gal4, UAS>lacZ* (don de J. Cagliero)
- **Clones mitotiques** : *Ubx>Flipase ; tub>GFP FRT40A* et *Ubx>Flipase ; ; tub>GFP FRT82B*

Lignées pour surexprimer une protéine couplée à un marqueur fluorescent : *UAS>histone2B::YFP ; UAS>histone2B::RFP* et *UAS-pon::GFP*

## II. Le système UAS/Gal4 (Fig.29)

La plupart des expériences de surexpression ont été réalisées en utilisant le système UAS/Gal4/Gal80<sup>ts</sup>. Le facteur de transcription Gal4 (découvert chez la levure et naturellement non présent chez la drosophile) se fixe au niveau de séquence spécifique UAS (Upstream Activated Sequence) et active l'expression des gènes en aval (Brand et Perrimon, 1993). La protéine Gal80 est un répresseur de Gal4. La forme thermosensible de cette protéine (Gal80<sup>ts</sup>) permet de moduler la fonctionnalité de Gal4 en fonction de la température : à 18°C Gal80 inhibe Gal4, alors qu'à 30°C, Gal80 étant sous forme inactive, Gal4 active l'expression des gènes sous le contrôle d'un promoteur UAS.

Dans le notum, la lignée *neuralized<sup>P72</sup>>Gal4* (où la production de Gal4 est sous le contrôle du promoteur du gène *neuralized* exprimé spécifiquement dans le lignage des soies) combinée à un transgène exprimant la Gal80<sup>ts</sup> de manière ubiquitaire (*tubuline>Gal80<sup>ts</sup>*) permet ainsi un contrôle temporel et spatial de l'expression des gènes possédant des séquences UAS dans leur promoteur. Dans la plupart des expériences que j'ai effectuée, la protéine de fusion Histone2B::YFP (dont l'expression est régulée par une séquence UAS) permet de visualiser les noyaux des cellules où la Gal4 est active. Ce système m'a permis aussi bien de réaliser des gains de fonction (*UAS>esg*) que des pertes de fonction par RNAi (*UAS>esg dsRNA*).



**Figure 30 : La technique de clones mitotiques**

Une lignée transgénique est hétérozygote pour la mutation (trait violet sur le chromosome rose) du gène x. Le même bras du chromosome homologue (bleu) porte une séquence codant de manière ubiquitaire la GFP (trait vert). Près du centromère (rond bleu ou rose) de ces chromosome, se trouvent des séquences issues de la levure FRT (Flippase Recognition Target). Lors de la division, la production de Flippase (orange), une endonucléase spécifique de la levure, induit des cassures doubles brins au niveau des séquences FRT. Lors de la réparation, un échange de chromatides entre les deux chromosomes homologues est alors possible (traits en pointillés). Après la division, on obtient deux cellules filles différentes : une homozygote pour la mutation du gène x (haut) et l'autre portant deux copies de la séquence codant la GFP (bas).

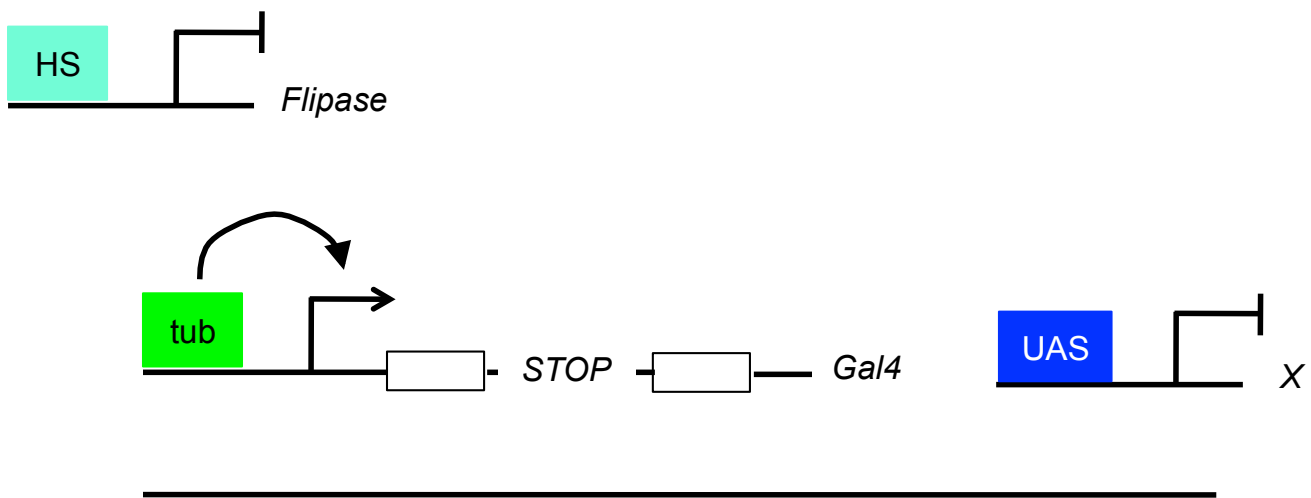
### III. Analyse clonale

#### 1. Clones mitotiques

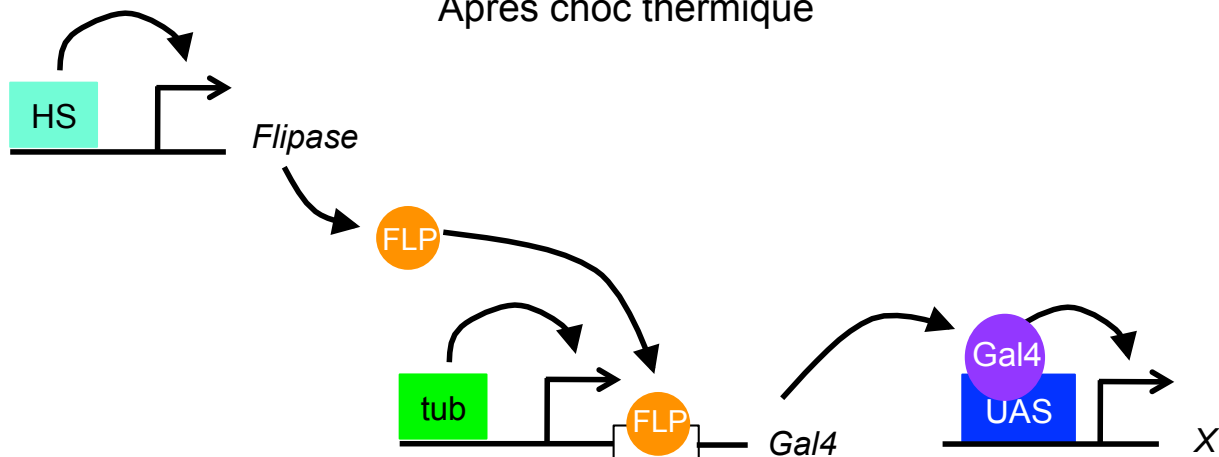
La technique de clone mitotique consiste dans la génération de groupes de cellules mutantes au sein d'un tissu hétérozygote (Fig.30). Les cellules mutantes sont obtenues suite à un échange de bras chromosomiques lors de la mitose. Cet échange est rendu possible grâce à l'action de la flippase (FLP), une enzyme qui induit des cassures double brin de l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées FRT (Flipase Recognition Target). Ainsi, lorsque ces séquences sont présentes sur chaque chromosome, au même locus, la flippase coupe l'ADN. Lors de la réparation, un échange de chromatides entre les deux chromosomes est alors possible. Si un chromosome porte une mutation récessive que l'autre n'a pas, alors l'échange de bras chromosomiques lors de la mitose permet la génération d'une cellule fille qui hérite de deux copies de la mutation alors que sa sœur hérite des deux copies du gène non muté. Classiquement, le chromosome non muté porte également, en plus de la séquence FRT, un marqueur tel que la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase (lacZ). Ce marqueur permettra d'identifier les cellules mutantes par leur absence de GFP/lacZ. Nous aurons donc trois types de cellules : des cellules hétérozygotes pour la mutation et qui expriment le marqueur, des cellules homozygotes pour la mutation dépourvues de GFP/lacZ et des cellules homozygotes non mutantes exprimant la GFP/lacZ. Ce système est un grand atout quand les mutations du gène étudié, comme pour les facteurs de la superfamille Snail, provoque une létalité embryonnaire. Ce système permet à l'individu de se développer au delà du stade embryonnaire (car il est hétérozygote pour la mutation récessive). De plus seul une partie des cellules sont mutantes. Elles sont donc entourées par des cellules non mutantes. Ceci permet de comparer des cellules mutantes et des cellules contrôles exactement au même stade de développement et obtenues dans des conditions strictement identiques.

Afin de générer des clones dans le notum, j'ai utilisé une lignée où la production de FLP est sous le contrôle du promoteur du gène *Ultrabithorax* (*Ubx*) qui s'exprime dans le disque d'aile. Du fait de son expression précoce, *Ubx>FLP* permet de générer de grands clones dans l'aile et le notum.

### Avant choc thermique



### Après choc thermique



**Figure 31 : La technique de clones de surexpression**

Une lignée transgénique contient (1) un promoteur thermosensible en aval la séquence codant la Flippase, un endonucléase issue de la levure, et (2) la séquence codant le facteur de transcription Gal4 en amont d'un promoteur ubiquitaire mais distants du fait de la présence d'une séquence codante (STOP) contenue entre deux sites FRT reconnus par la flippase. Une seconde lignée transgénique contient les séquences UAS (bleu) en amont de la séquence d'intérêt x. Le croisement de ces deux lignées et un choc thermique entraîne la production de la Flippase. La Flippase se fixe sur les séquences FRT, induit des cassures double brin de l'ADN et lors de la réparation, la séquence codante (STOP) est éliminée et la Gal4 est produite. La protéine Gal4 se fixe sur ses séquences cibles UAS et induit l'expression du gène x. Ainsi seules les cellules où la Flippase induit des recombinaisons exprimeront le gène x. Généralement elles sont identifiées grâce à un autre transgène contenant la séquence codant un rapporteur (par exemple GFP) en aval d'un promoteur UAS.

## 2. Clones de surexpression

La technique de clone de surexpression permet de surexprimer une protéine dans une population de cellules au sein d'un organisme, évitant ainsi la létalité souvent causée par une surexpression ubiquitaire ou précoce (Fig.31). Cette technique également utilise le système FLP/FRT sauf que dans ce cas les séquences FRT sont localisées sur un même chromosome de part et d'autre d'une séquence codante avec en amont un promoteur ubiquitaire (comme celui de la tubuline) et en aval la séquence codant pour la Gal4. En absence de FLP, le promoteur de la tubuline active l'expression de la séquence codante présente entre les séquences FRT. Le signal d'arrêt de la transcription présent dans cette séquence fait que la Gal4 n'est pas produite. Lorsque la flippase est présente, l'ADN est coupé au niveau des séquences FRT et lors de la réparation, la séquence codante présente entre les sites FRT est éliminée. Le promoteur de la tubuline peut donc activer la production de Gal4 qui à son tour induit l'expression des gènes sous le contrôle d'un promoteur UAS.

Afin de générer des clones de surexpression dans le notum et le disque d'aile, j'ai utilisé une FLP sous le contrôle d'un promoteur thermo-inductible. Le choc thermique est généralement réalisé dans des larves de stade L1. Cette lignée étant combinée à un rapporteur UAS>histone2B::GFP ou UAS>histone2B::LacZ, les cellules clonales sont respectivement marquées par la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase.

## IV. Immunomarquage

### 1. Procédures expérimentales

#### (1) *Dissection de notum*

Les individus sont prélevés au stade « pupe blanche », c'est à dire au moment de la formation du puparium et gardés à 25°C (sauf mention contraire) jusqu'au moment de la dissection. Les nota sont disséqués dans du tampon PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7,5). La pupe est fixée par deux fines aiguilles, face ventrale vers le haut. Le sommet de la partie antérieure est coupé et une incision est pratiquée sur la cage pupale de la tête jusqu'à l'abdomen. La cage pupale est ensuite retirée délicatement avec des pinces. La pupe est ainsi « mise à nue » de la tête jusqu'à l'abdomen. Ensuite la tête est coupée et les parties latérales incisées en prenant comme point d'entrée la tête de la pupe, permettant ainsi que la région ventrale du thorax soit retirée. Avec une pince,





les trachées et l'intestin sont délicatement retirés. Les particules de gras ainsi que les muscles sont évacués grâce à un flux de PBS créé avec une pipette. Les zones les plus latérales sont ensuite retirées, ne laissant qu'une fine bande centrale toujours attachée à l'abdomen.

La dissection est ensuite fixée pendant 20 minutes (sauf pour *esg::GFP* où le temps de fixation est de 40 minutes) dans une solution contenant 4% de paraformaldéhyde avant d'être remplacée par du PBT (PBS + 0,1% triton X100). La fine bande de tissu dorsale est alors séparée de l'abdomen et placée dans une coupelle contenant du PBT où seront effectués trois rinçages de 10 minutes. Les nota sont par la suite incubés avec les anticorps primaires dilués dans du PBT et laissés pendant 1 heure à température ambiante ou bien sur la nuit à 4°C. Trois lavages de 10 minutes dans du PBT sont réalisés après chaque bain d'anticorps. Les nota sont ensuite incubés avec les anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante dans une chambre opaque puis rincés trois fois pendant 10 minutes dans du PBT. Enfin les nota sont transférés dans du PBS/Glycérol (20/80) pendant 1 heure avant d'être montés entre lame et lamelle dans une goutte de milieu de montage (PBS 1X, Glycérol et 1% propylgalate).

## (2) *Dissection du disque d'aile*

Les larves sont prélevées au stade L3 et déposée dans une coupelle contenant du PBS froid. Sur une lame de verre contenant du PBS, les larves sont coupées au tiers à partir de la région antérieure et retournées sur la pince. Le corps gras et autres tissus (glandes salivaires) sont délicatement retirés avec une pince. La partie restante de la larve est ensuite incubée pendant 20 minutes dans une solution de paraformaldéhyde 4% avant d'être rincée trois fois 10 minutes dans du PBT 0,3% (PBS + 0,3% triton X100). Comme pour les nota, les larves sont ensuite incubées pendant 1 heure ou une nuit dans l'anticorps primaire, rincées trois fois 10 minutes dans du PBT 0,3% puis incubées 1 heure dans l'anticorps secondaire avant un nouveau rinçage de trois fois 10 minutes dans du PBT 0,3%. Finalement, les larves sont recouvertes par du PBS/Glycérol (20/80) et le disque d'aile est alors isolé avant d'être déposé entre lame et lamelle dans une goutte de milieu de montage.



### (3) Immunomarquage d'embryon

Les mouches adultes sont isolées dans une cage reposant sur un milieu de ponte agrémenté d'une noisette de levures hydratées. La cage est alors déposée dans une étuve réglée à 25°C pendant le temps de la ponte au bout duquel le milieu de ponte est retiré. Les embryons sont ensuite laissés à 25°C jusqu'à atteindre le stade souhaité (déterminé par le temps écoulé entre le début de la ponte et le moment de la fixation). Les embryons sont ensuite détachés du milieu de ponte grâce à un brossage délicat avec un pinceau dans de l'eau avant d'être transférés dans ce qu'on pourrait décrire comme une « passoire » (un tube fermé par un filet avec un maillage fin). Les embryons sont ensuite rincés sous un filet d'eau courante jusqu'à ce que toute la levure soit retirée. Le chorion des embryons est alors retiré grâce à un bain de 2 minutes dans de la javel 4% puis les embryons sont rincés abondamment sous un filet d'eau continu.

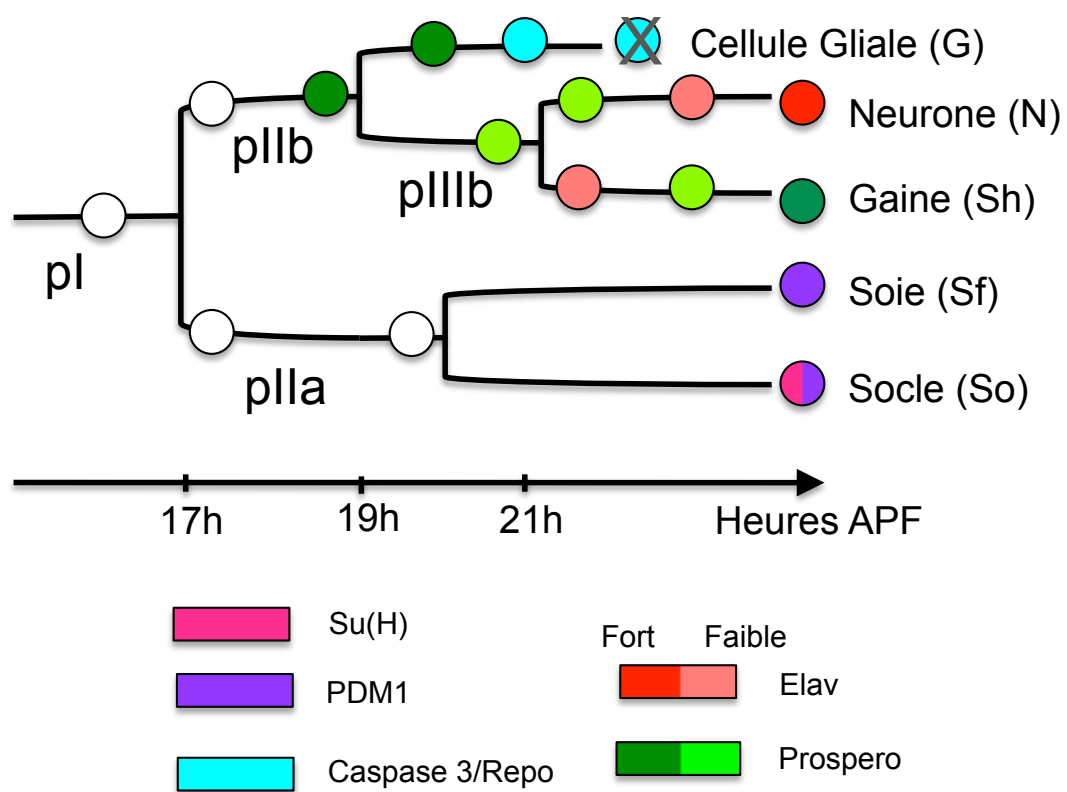
Après avoir bien retiré toute l'eau, les embryons sont plongés dans une solution d'heptane avant d'être rapidement prélevés et incubés 5 minutes dans un tube en verre contenant un mélange heptane/formaldéhyde 37% (50/50). A la fin de l'incubation, la phase inférieure, correspondant au formaldéhyde, est retirée avec une pipette pasteur en prenant garde à ne pas aspirer les embryons avec. Le même volume de méthanol est alors ajouté et le tube est fortement agité pendant 1 minute. Les embryons ayant plongé au fond du tube sont alors prélevés avec une pipette pasteur et déposés dans un tube eppendorf 1,5ml. Ils sont ensuite rincés trois fois dans du méthanol avant d'ajouter un mélange eau distillée/méthanol (50/50, le mieux étant de mettre d'abord le méthanol dans le tube eppendorf et d'ajouter ensuite doucement le même volume d'eau distillée).

Pour finir, les embryons sont rincés trois fois 10 minutes dans du PBT avant d'être immunomarqués comme cela a été décrit dans les dissections précédentes. Pour être déposés entre lame et lamelle, une pipette dont l'extrémité du cône a été sectionnée est utilisée.

## 2. Anticorps utilisés

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

Dirigé contre	Fait chez	Dilué au	Origine
$\beta$ -Galactosidase	Souris	1/500	
$\beta$ -Galactosidase	Lapin	1/500	Cappel
Caspase3 active	Lapin		BD Biosciences Pharmingen



**Figure 32 : Marqueurs utilisés dans cette étude pour identifier les différents types cellulaires dans le lignage des soies mécanosensorielles.**

Cut	souris	1/500	DSHB
Elav	Rat	1/100	DSHB
Escargot	Rat	1/500	Don de S. Hayashi
Futsch (22C10) concentré	Souris	1/200	DSHB
GFP	Souris	1/1000	InVitrogen
GFP	lapin	1/500	
Nerfin-1	Cochon d'Inde	1/500	Don de W. Odenwald
Pdm1	Lapin	1/1000	DSHB
Phospho-HistoneH3	Lapin	1/1000	Upstate Biotechnology
Phospho-Tyr	Rat	1/500	Abcam
Prospero	Souris	1/500	Don de C. Doe
Repo	Souris	1/5	Don de B. Jones
Su(H)	Rat	1/1000	Don de F. Schweisguth
Tramtrack69	Lapin	1/200	Don de Travers
Wingless	Souris	1/500	DSHB

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants :

Dirigé contre	Fluorochrome	Fait chez	Dilué au	Origine
Souris	488	chèvre	1/1000	Molecular Probes
	568	chèvre	1/1000	Molecular Probes
	660	chèvre	1/1000	Molecular Probes
Lapin	488	chèvre	1/1000	Molecular Probes
	568	chèvre	1/1000	Molecular Probes
	660	chèvre	1/1000	Molecular Probes
Rat	488	chèvre	1/1000	Molecular Probes
	568	chèvre	1/1000	Molecular Probes
	660	chèvre	1/1000	Molecular Probes
Cochon d'Inde	568	chèvre	1/1000	Molecular Probes

Afin de simplifier la compréhension des immunomarquages, j'ai réuni sous forme de schéma l'expression de différents facteurs utilisés de manière répétée dans mes expériences comme marqueurs d'identité cellulaire dans le lignage des soies (Fig.32).



### **3. Incorporation d'EdU**

Afin de déterminer les cellules en cours de répllication de leur ADN, j'ai utilisé la technique d'incorporation du 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). Cette méthode demande une préparation moins longue et surtout est moins délétère pour les fluorochromes présents dans le tissu (pas de dénaturation de l'ADN dans un bain de HCl).

J'ai donc disséqué les nota dans un milieu M3 complet (SVF 2%, ecdysone 0,5mg/ml, insuline 0,2U/ml). Les nota sont ensuite incubés 30 minutes dans du milieu complet additionné d'EdU (10 $\mu$ M). Par la suite, j'ai réalisé un immunomarquage standard et l'EdU est révélée grâce au kit Click-iT™ EdU (Invitrogen).

## **V. Dissection de nota et d'ailes adultes.**

### **1. Dissection de nota**

La mouche au stade pharate est fixée par deux aiguilles sur un support en silicone, face ventrale vers le bas. La cage pupale est retirée grâce à une pince après incisions au niveau de la tête puis le long de l'axe tête-abdomen. La tête est ensuite retirée et deux incisions latérales juste au dessus de la base de l'aile permettent de détacher le thorax dorsal. Celui-ci est ensuite placé dans un bain de Hoyer (gomme arabique 600mg/ml, chloral hydrate 4g/ml, glycérol 400mg/ml) additionné d'acide lactique (1:1) pendant 24 heures. L'acide lactique va permettre de dissoudre les tissus toujours présents sur la cuticule. La cuticule restante est montée entre lame et lamelle (rehaussée légèrement par deux lamelles découpées) dans une goutte de Hoyer. Le tout est incubé une nuit à 50°C afin que le Hoyer polymérise.

### **2. Dissection d'aile adulte**

Les mouches sont endormies par un flux de CO<sub>2</sub>. Elles sont ensuite fixées sur un support en silicone grâce à deux aiguilles plantées au niveau de l'abdomen. Elles sont ensuite immergées pendant quelques secondes dans un bain d'éthanol 70%. Les ailes sont ensuite découpées et déposées dans une goutte de Hoyer entre lame et lamelle.





## **VI. Imagerie**

### **1. Observations des nota et ailes adultes**

Les nota et ailes sont observés sous lumière blanche à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse 80i. Ce microscope, possédant une fonction de contraste différentiel, permet d'obtenir des images de nota « en relief ».

### **2. Observations de tissus fixés immunomarqués**

Les échantillons immunomarqués sont observés sous un microscope à épifluorescence Olympus BX41 couplé à un spinning disc, muni d'un caméra numérique (Cool Snap), d'un obturateur mécanique (Unblitz) et d'un piezo électrique permettant de faire des variations automatique en Z. L'acquisition des images s'effectue à l'aide du logiciel Metamorph (Universal Imaging). Les données sont ensuite traitées sous ImageJ.

### **3. Observations de notum *in vivo***

#### *(1) Préparation des pupes à l'imagerie in vivo*

La pupa est isolée au début de la pupaison et placée à 25°C (sauf mention contraire) jusqu'au stade souhaité. Elle est ensuite nettoyée avec un pinceau humide pour retirer tout le milieu restant puis placée quelques secondes dans un bain d'éthanol 70% afin de retirer toute l'eau. La pupa est ensuite collée sur une lame grâce à un ruban adhésif double face, face ventrale vers le bas. L'opercule situé au niveau de la tête est délicatement retiré avec une pince puis, toujours avec la même pince glissée entre la cage pupale et la pupa, la cage pupale est très délicatement découpée de la tête jusqu'à l'abdomen. Grâce à cette incision, la cage pupale est écartée de la pupa et collée sur le ruban adhésif adjacent. La pupa est ensuite délicatement décollée du ruban adhésif grâce à un pinceau fin humide. Elle est prélevée avec une pince et placée sur une plaque métallique reliée à un système de contrôle de la température (Coyote M.Gho®). La pupa est entourée par une mousse humide et recouverte (en veillant à ne pas l'écraser) par une lamelle enduite d'huile Voltalef 10S.

#### *(2) Imagerie in vivo (Time-Lapse)*

Le montage est alors placé sous un microscope Olympus BX41 couplé à un spinning disc. Après sélection d'une zone adéquate, le microscope est alors réglé pour prendre des images de cette zone toutes les 3 minutes. L'image peut être composée de différents points selon l'axe en Z.



## **VII. Quantification des axones**

### **1. Quantification de la longueur des axones**

Cette quantification a été réalisée lors de l'analyse clonale de la perte de fonction d'*esg*. En effet, ce contexte permet de disposer de contrôles exactement au même point développemental que les mutants analysés. A chaque fois j'ai donc comparé la longueur d'un axone mutant à celle de son controlatéral non mutant.

Pour se faire, les nota (marqués par l'anticorps spécifique des axones 22C10) sont imagés en mosaïque à l'objectif 40X sur différents plans en Z (du début à la fin de l'axone). Le réassemblage du notum complet est réalisé, sous ImageJ avec le plugin MosaicJ, à partir d'aplatissements des différentes sections en Z de chaque image en ne retenant que les points avec une intensité maximum (projection maximum). Il est à noter que pour chaque projection maximale, les niveaux de gris ont été modifiés uniformément. La longueur des axones est ensuite déterminée sous ImageJ à l'aide du plugin NeuronJ et la longueur de chaque paire de neurone m'a permis d'établir un ratio longueur de l'axone mutant sur longueur de l'axone sauvage. Les mêmes mesures ont été effectuées pour déterminer un ratio longueur de l'axone sauvage du côté droit/ longueur de l'axone sauvage du côté gauche. Les deux types de ratio ont ensuite été comparés par un test de Mann et Whitney.

### **2. Quantification des défaut d'arborisation axonale**

Les défauts d'arborisation axonale ont été déterminés visuellement. Du fait de la grande diversité dans les trajectoires des axones du notum, j'ai focalisé mon analyse sur les axones de la première rangée (la plus éloignée des macrochaetes, en bordure de la ligne médiale). Pour chaque notum, disséqué 28hAPF et marqué par 22C10, j'ai déterminé si un ou plusieurs axones traversaient ou étaient sur le point de traverser la ligne médiale.



# Résultats



La mise en place de l'identité cellulaire au cours du développement est un processus complexe qui requiert la coordination de différents signaux intrinsèques et extrinsèques. Dans le lignage des soies mécanosensorielles de la drosophile, divisions asymétriques et activation différentielle de la voie Notch sont au cœur du processus de détermination cellulaire permettant de générer cinq types cellulaires différents à partir d'une cellule précurseur unique.

Cependant l'activation différentielle de la voie Notch à chaque division ne permet pas d'expliquer, à elle seule, la mise en place de quatre identités cellulaires fonctionnellement et morphologiquement différentes. Il est pertinent de s'interroger si d'autres facteurs participent au processus de détermination cellulaire dans ces organes. Au cours de ma thèse j'ai eu pour objectif d'identifier et d'analyser des facteurs pouvant être impliqués dans la régulation de la détermination cellulaire dans le lignage des soies mécanosensorielles.

Dans ce but, j'ai étudié les membres de la superfamille Snail, des facteurs connus pour leur implication dans la neurogenèse. En effet le point de départ de cette étude a été l'observation qu'Esg, considéré comme le membre fondateur de la famille Snail, est exprimé dans le précurseur neural *pllb* (thèse de Pierre Fichelson). Au cours de ces quatre années de thèse, par des analyses génétique et cellulaire, j'ai analysé l'implication d'Esg et des autres membres de superfamille Snail lors la mise en place de l'identité neurale et neuronale dans les organes mécanosensoriels.

## **I. Escargot et Scratch participent à la formation du sous-lignage neural dans les soies mécanosensorielles de la drosophile.**

### **1. Escargot et Scratch régulent l'identité neurale et neuronale dans les organes sensoriels de la drosophile.**

Afin d'analyser l'implication d'Esg et des membres de la superfamille Snail lors de la formation du lignage des soies mécanosensorielles, j'ai analysé l'effet d'une perte de fonction de ces facteurs par RNAi sur les cellules externes (soies et socles). Cette étude a mis en évidence que la double perte de fonction *esg/scrt* conduit à une duplication des structures externes qui n'est pas observée lorsqu'un seul de ces facteurs est éliminé. Au niveau cellulaire, cette transformation se traduit par des organes composés uniquement de cellules externes (deux soies, deux socles) et dépourvues de cellules internes





(neurone et de cellule gaine). L'utilisation de RNAi pouvant souvent altérer l'expression d'autres facteurs, cette observation a été confirmée lors de la diminution de ces facteurs par d'autres stratégies génétiques (clones mitotiques d'un allèle nul *esg* en contexte hétéroallélique pour *scrt*). Réciproquement, la surexpression d'un seul de ces facteurs induit la formation d'organes composés uniquement de cellules internes et les mouches adultes obtenues sont « chauves » (autrement dit avec des organes sensoriels dépourvus de cellules externes). Ensemble, ces résultats suggèrent qu'Esg et Scrt contribuent de manière redondante à la formation du sous lignage interne.

De manière intéressante, j'ai montré qu'*esg* et *scrt* ont exactement le même profil d'expression : leur expression commence dans le précurseur secondaire pIIb peu de temps avant sa division et est maintenue dans toutes les cellules filles de pIIb (cellule gliale, pIIIb, neurone et gaine). Cette similitude d'expression entre *esg* et *scrt* renforce l'hypothèse d'un effet redondant de ces facteurs lors de formation du sous-lignage neural. En accord avec cette hypothèse, j'ai montré que la perte de fonction *esg* et *scrt* provoque une transformation du précurseur secondaires neural pIIb en pIIa, générant ainsi des organes composés uniquement de cellules externes. Réciproquement, la surexpression d'Esg ou Scrt provoque une transformation du précurseur pIIa en pIIb, produisant des organes composés uniquement de cellules internes. Ces données indiquent qu'Esg et Scrt, en agissant de manière redondante, sont nécessaires et suffisants pour la mise en place de l'identité neurale pIIb. En tenant en compte que ces facteurs sont exprimés peu avant la division de pIIb, soit après que la cellule soit spécifiée, ils ne peuvent pas jouer le rôle de déterminants de l'identité pIIb. Je propose qu'Esg et Scrt interviennent dans le maintien plutôt que dans la spécification de l'identité pIIb.

La mise en place de l'identité pIIa est dépendante de l'activation de la voie Notch. Ainsi la transformation de pIIb en pIIa lors de la double perte de fonction *esg/scrt* implique que la voie Notch ait été activée de manière ectopique dans la cellule pIIb. Afin de déterminer si *esg* et *scrt* interagissent avec la voie Notch j'ai réalisé des tests d'interaction génétiques. Cette analyse a mis en évidence que la fréquence du phénotype de duplication des organes externes lors de la double perte de fonction *esg/scrt* diminue ou augmente lorsque la voie Notch est respectivement diminuée ou augmentée. Ces observations montrent qu'Esg et Scrt interagissent avec la voie Notch. De plus elles



suggèrent que le maintien de l'identité pIIb par Esg et Scrt consiste en un blocage de l'activation ectopique de Notch dans cette cellule.

Bien qu'Esg et Scrt interviennent dans la régulation de l'identité du précurseur neural, il est intéressant de noter que leur expression est maintenue dans toutes ses cellules filles. Ceci m'a amené à considérer un potentiel rôle d'*esg* et *scrt* dans ces cellules. Or l'analyse clonale de la perte de fonction *esg* montre une diminution significative de la taille des axones des neurones mutants ainsi qu'une altération de leur arborisation. Par contre la perte de fonction *scrt* ne génère pas de défauts similaires et les neurones mutants *esg/scrt* ne présentent pas d'aggravation de ce phénotype. Ensemble, ces données montrent qu'Esg, mais pas Scrt, serait impliqué lors de la différenciation neuronale dans le lignage des soies mécanosensorielles. Il est à noter que l'implication d'Esg dans le contrôle de la différenciation neuronale est conservée dans d'autres organes sensoriels. En effet dans des embryons mutants *esg*, j'observe une altération de l'arborisation axonale des neurones du système nerveux périphérique. Comment Esg régule-t-il la différenciation neuronale ?

Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une perte de fonction *esg* spécifiquement dans les organes mécanosensoriels (en exprimant grâce à *neuralized<sup>p72</sup>>gal4* un RNAi dirigé contre *esg*). Dans ce contexte, je retrouve les défauts d'arborisation observés lors de l'analyse clonale, indiquant qu'Esg agit de manière autonome cellulaire. De plus, une perte de fonction *esg* réalisée spécifiquement dans le neurone (en exprimant grâce à *elav>gal4* un RNAi dirigé contre *esg*) conduit à des phénotypes similaires à ceux observés lorsque la perte de fonction est effectuée dans toutes les cellules du lignage. Ceci indique que la présence d'Esg dans les précurseurs pIIb et pIIIb ne participe pas au contrôle de la différenciation neuronale. Ainsi l'implication d'Esg dans la différenciation neuronale est autonome cellulaire mais également spécifique au neurone.

Ce phénotype de retard de la croissance axonale est-il du à un problème au niveau de la cadence des divisions cellulaires ? Plus particulièrement à un retard de la division de la cellule pIIIb ? En effet, si le neurone est généré tardivement, alors sa différenciation et le développement de ses neurites se feront en retard par rapport aux organes non mutants. Toutefois, que ce soit sur tissu fixé ou lors d'une analyse *in vivo*, aucune variation significative du moment de la division de la cellule pIIIb (cellule mère du neurone) n'a été observée entre les organes *esg* mutants et contrôles.



Alternativement l'effet de la perte de fonction *esg* sur la différenciation neuronale pourrait s'expliquer par une perturbation de la détermination neuronale. A des stades tardifs, aucune altération de l'identité neuronale dans des organes mutants *esg* n'a été observée. Par contre, à des stades plus précoces où l'identité neuronale est en train de se mettre en place, la progression de la détermination neuronale est retardée dans des organes *esg* mutants. Au début de la vie du neurone, les facteurs Prospero (Pros) et Elav sont exprimés séquentiellement. Dans des neurones *esg* mutants la dynamique d'expression de *pros* et *elav* est retardée par rapport aux organes contrôles. Ainsi Esg contrôlerait la progression de la détermination neuronale.

Un retard de la dynamique de la détermination neuronale peut-elle affecter la croissance et l'arborisation des axones ? Deux observations tendent à confirmer ce lien : d'une part le rétablissement de l'expression d'*elav* dans un contexte de perte de fonction *esg* sauve partiellement les défauts d'arborisation axonale et d'autre part le maintien de l'expression de *pros* dans le neurone provoque, comme lors d'une perte de fonction *esg*, une modification de la trajectoire des axones. Ensemble ces résultats montrent que la dynamique de la détermination neuronale est importante pour l'arborisation axonale. De plus ils suggèrent qu'Esg influence la croissance et la trajectoire des axones en régulant la progression de la détermination neuronale. Toutefois, alors que la perte de fonction *elav* ne provoque pas de défaut de différenciation neuronale, celle de *pros* aboutit à une absence de détermination et de différenciation neuronales dans 40% des organes. Ceci montre que Pros est un élément essentiel à la détermination neuronale. De plus cela suggère que les défauts d'arborisation axonale des neurones *esg* mutants découleraient majoritairement de la dérégulation de l'expression de *pros* dans ce contexte.

Pour résumer, j'ai montré que deux membres de la superfamille Snail, Esg et Scr1 participent de manière redondante au maintien de l'identité neurale en empêchant l'activation de la voie Notch dans le précurseur neural. De plus, Esg a un rôle additionnel dans la régulation temporelle de la détermination neuronale et dans l'établissement des connections neuronales.



**Escargot and Scratch regulate neural commitment in *Drosophila* sensory organs**

Anne Ramat<sup>1</sup>, Agnès Audibert<sup>1</sup>, Sophie Louvet-Vallée<sup>1</sup>, Françoise Simon<sup>1</sup>, Pierre Fichelson<sup>2</sup> and Michel Gho<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>- Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR 7622, Laboratory of Developmental Biology, F-75005, Paris, France.

<sup>1</sup>- CNRS, UMR 7622, Laboratory of Developmental Biology, F-75005, Paris, France.

<sup>2</sup>- Health Interactions, Admiral House, 76-78 Old Street, London, EC1V 9AZ, United Kingdom

Corresponding author: Michel Gho : [Michel.gho@snv.jussieu.fr](mailto:Michel.gho@snv.jussieu.fr)

Running title: Neural commitment of precursor cells.





## Summary

Neural precursor cells have the potential to become neurones and this capacity is not acquired during the cell division program that these progenitors undergo. The mechanisms that maintain neural commitment in precursor cells remain largely unknown. Here we show that two members of the Snail superfamily of transcription factors, Escargot and Scratch, are specifically expressed in neural progenitors in the *Drosophila* bristle lineage. Both Escargot and Scratch genetically interact with the Notch pathway and redundantly maintain neural precursor cell commitment. Moreover, Escargot but not Scratch is involved in neuronal determination and axon patterning. Our data suggest that the action of Escargot relies on a cell-autonomous regulation of the expression of neuronal differentiation factors such as ELAV and Prospero. Snail-related transcription factors are thus involved in the maintenance of neural commitment of progenitor cells as well as in neuronal differentiation.

## Highlights

*esg* and *scrt*, acting redundantly, are necessary and sufficient to promote neural fate

Esg, Scrt and N-pathway interact in the control of neural fate commitment

Esg, but not Scrt, controls cell-autonomous axon patterning

Esg regulates expression of neuronal differentiation genes as *elav* and *prospero*



## Introduction

Nervous system formation relies on tight spatial and temporal interactions between cell proliferation, determination and differentiation. These interactions are clearly observed in developmentally regulated neural cell lineages where neurones originate from single neural stem cells that undergo stereotyped patterns of cell divisions. These neural progenitor cells are originally committed to become neurones, as revealed by the fact that cell cycle-arrested neural progenitor cells adopt a terminal neuronal identity (Brown et al., 2003; Hartenstein and Posakony, 1990; Lacomme et al., 2012). How neuronal commitment is maintained throughout progenitor cell proliferation remains as yet unknown.

Genes belonging to the Snail and Scratch families (combined in the so-called Snail superfamily) encode closely related zinc-finger transcriptional repressors as well as activators that are fundamental for metazoan development (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). In *Drosophila*, *snail* (*sna*), *escargot* (*esg*) and *worniu* (*wor*) compose the Snail gene family and *scratch* (*scrt*) genes compose the Scratch family. Genes of these families are involved in a wide range of cellular functions ranging from the control of large-scale cell movements (Grau et al., 1984; Leptin and Grunewald, 1990; Oda et al., 1998), organogenesis (LaBonne and Bronner-Fraser, 2000; Nieto et al., 1994), cell cycle regulation (Fuse et al., 1994; Hayashi, 1996; Nakayama et al., 1998) and cell determination (Fuse et al., 1996; Yan et al., 2013). While the involvement of Snail factors during cell migration has been investigated in depth, their role in the control of organogenesis and cell fate determination remain poorly understood in spite of evidence accumulated notably from studies on *Drosophila* neurogenesis. For instance, the ventral nerve cord is severely underdeveloped in *Drosophila* embryos harbouring a deletion that cover *esg*, *sna* and *wor* genes (Ashraf et al., 1999; Ashraf and Ip, 2001; Cai et al., 2001). In this context, neural defects can be rescued by the expression of any of these Snail-related factors, suggesting overlapping or redundant functions. Moreover, *sna*, *esg* and *wor* also act redundantly in the process of "telophase rescue", a compensatory mechanism that partially corrects localization defects of cell fate determinants during neuroblast divisions (Ashraf and Ip, 2001; Cai et al., 2001). These factors can also act individually in neurogenesis. For example, *Wor* is required to promote cell-cycle progression and to inhibit premature differentiation in neuroblasts (Lai et al., 2012). In contrast, *Esg* promotes neuronal formation in the olfactory system of



*Drosophila* (Hartl et al., 2011). Finally, Scrt has been attributed a role in peripheral neuronal determination (Roark et al., 1995). Taken together, these data indicate that Snail/Scratch factors are involved in neurogenesis, however little is known about the molecular basis of their involvement.

The *Drosophila* bristle cell lineage is a well-suited model to study fundamental mechanisms controlling neuronal commitment of progenitor cells (Gho et al., 1999; Lai and Orgogozo, 2004). In this lineage, a primary precursor cell called pI undergoes a stereotyped sequence of oriented asymmetric cell divisions and generates a neurone and four other differentiated cells forming the sensory organs (Fichelson and Gho, 2003; Gho et al., 1999). As they repeatedly divide, pI cells transit through two different precursor states (pIIb and pIIIb) before acquiring a neurone identity. The pI cell division produces the secondary precursor cells, pIIb and pIIa. The pIIa cell gives rise to the outer terminal cells, the socket and the shaft cells. The pIIb cell is at the origin of the inner cells, the glial cell (that disappears by apoptosis) and the tertiary precursor cell pIIIb, which then generates the sheath cell and the neurone. During differentiation, neurones innervate the sensory organ to which they are clonally related and the thoracic ganglia via an axon that starts to develop at about 23 h after pupal formation (APF). In each hemi-thorax, axons extend, fasciculate with each other and converge, following a medio-lateral direction, toward the neural track of the dorso-central macrochaetes (Usui-Ishihara et al., 1995). Because of its simplicity and accessibility, the bristle lineage represents an ideal system to identify mechanisms involved in key steps of neurogenesis, ranging from neural commitment of progenitor cells to terminal neuronal differentiation and axonogenesis.

In the bristle lineage, at each division, both daughter cells acquire different identities due to the differential activation of the Notch-pathway (N), an evolutionarily conserved cell-signalling pathway present in all metazoans and involved in numerous developmental processes (Guruharsha et al., 2012). In *N* loss-of-function, all cells acquire a neuronal fate and, conversely, sensory organs composed exclusively by socket cells are observed after continuous ectopic activation of the N-pathway. The differential activation of the N-pathway between daughter cells has been well documented during pI division: one daughter cell, pIIb ( $N_{\text{off}}$  cell), acts as a N-signal sender and its sibling, pIIa ( $N_{\text{on}}$  cell), is a N-signal receiver (Guo et al., 1996). The bias in the activation of the N-pathway is mainly



assured by the stereotyped segregation in one daughter cell (the future pIIb cell) of determinant factors as Numb and Neuralized (Neur) (Guo et al., 1996; Le Borgne and Schweisguth, 2003; Morin and Bellaiche, 2011). While the molecules and signalling pathways involved in such asymmetric processes have been investigated in depth, factors that maintain neural commitment over rounds of divisions are unknown. Similarly, how specific fates are assigned at each round of division remains unclear.

Growing evidence indicates that Snail factors interact with N during normal development and pathological contexts. In the *Drosophila* embryo, Snail cell-autonomously represses N-signalling and, in a non-autonomous manner, promotes N-activation to correctly position the frontier between mesoderm and neuroectoderm (Morel et al., 2003). A similar mechanism has been suggested for Snail factors in neural precursor cells during early neurogenesis (Ashraf et al., 1999; Ashraf and Ip, 2001; Cai et al., 2001). Interestingly, direct interaction between the intracellular domain of the Notch receptor and Snail has been reported in hepatocellular carcinoma cells (Kim et al., 2013; Lim et al., 2011). Considering the importance of N in cell fate determination in the bristle lineage, this cell lineage is an ideal model system in which to dissect potential interactions between Snail-related transcription factors and N during neurone commitment and determination.

Here we show that *Esg* and *Scrt* are specifically expressed in the pIIb-sublineage and act redundantly to maintain the binary pIIb/pIIa fate-decision. Later on in development, *Esg*, but not *Scrt*, is involved in neuronal differentiation and in axon patterning. *Esg* acts cell autonomously to regulate the expression of factors involved in neurogenesis such as *Pros* and *ELAV*. We propose, that *esg* and *scrt* belong to a pool of genes that are expressed during the early steps of neurogenesis and underlie intrinsic capabilities of progenitor cells to ultimately differentiate into sensory neurones.





## Results

### *Downregulation of *esg* and *scrt* leads an inner-to-outer cell transformation.*

In a screen to identify mechanisms involved in neural commitment, we analysed the effect of the deregulation of members of the *Drosophila* Snail gene superfamily on mechanosensory organs. Using clonal and RNAi strategies, we observed that external sensory structures were not affected when *esg* or *scrt* were down-regulated individually (Figure 1A-C). In contrast, when both *esg* and *scrt* were downregulated, sensory organs with two shafts were observed (Figure 1D). This phenotype was observed in 48% of the flies (n=83) when *esg* and *scrt* were downregulated using an RNAi strategy. Similar double-shaft structures were also observed in *esg* null clones induced in the heteroallelic *scrt*<sup>jo11/jo16</sup> background (Fig. 1G). The double-shaft phenotype may be due to a cell transformation of inner cells to outer cells or to extra-divisions in the outer cell sublineage. To discriminate between these two possibilities, we analyzed the final cellular composition of lineages where *esg* and *scrt* were downregulated. In control conditions, after apoptosis of the glial cell, each sensory organ was composed of four cells, two of which expressed the outer-cell marker Pdm1 (Figure 1E, (Fichelson and Gho, 2004)). In addition, one of these outer cells expressed a high level of Su(H), a socket cell marker (not shown, (Gho et al., 1996)). After *esg* and *scrt* downregulation, sensory organs were also composed of no more than four cells (Figure F, H, H'). Moreover, except for the apoptosis of glial cells, we never observed other cells in the process of fragmentation (not shown). These observations rule out the possibility that double shaft sensory organs were due to extra-divisions of outer cells and suggest that they arise from a cell fate transformation. Consistent with this hypothesis, after *esg* and *scrt* downregulation, we observed sensory organs formed exclusively of four outer cells (Pdm1-positive, Figure 1F', asterisks), including two socket cells (Su(H)-positive, Figure 1H', asterisks). In addition, in these clusters, cells never expressed the inner cell markers ELAV, a splicing regulator, and the transcription factor Prospero (Pros), which identify neurones and sheath cells respectively (Figure 1F'', asterisks). Taken together, these observations show that the extra set of external structures, observed after downregulation of both *esg* and *scrt*, is due to a cell transformation in which inner cells adopt an outer cell fate.



We next studied whether *Esg* and *Scrt* are sufficient to determine inner cell fates. Overexpression of *scrt* (*HS>scrt*) at 16h APF gave rise to flies harbouring a severe bristle loss phenotype (Figure 1I). As shown in Figure 1J (asterisks), this external phenotype was associated with sensory organs formed exclusively of inner cells (identified by the lack of *Pdm1* staining, Figure 1J'), two of them neurones (ELAV-positive cells, Figure 1J''). Similar sensory organs composed exclusively of inner cells (ELAV-positive neurones and *Pros*-positive sheath cells) were also observed when *esg* was overexpressed (using the *HS>Gal4* driver heat-shocked at 16 h APF, Fig. S1). These observations show that overexpression of *esg* or *scrt* is sufficient to induce a cell transformation where outer cells acquire inner cell fate identities.

Our results show that inner to outer cell transformation was induced only when *esg* and *scrt* were jointly downregulated and a converse cell transformation was observed after overexpression of one of them. As such, *esg* and *scrt*, acting redundantly, are necessary and sufficient to promote inner cell fate decisions.

#### *Esg, Scrt and N interact in the control of inner cell fates.*

The inner to outer cell transformation induced after *esg* and *scrt* downregulation is reminiscent to that observed after overactivation of the N-pathway. Conversely, overexpression of *esg* or *scrt* mimics N-pathway downregulation. This prompted us to test whether *esg* and *scrt* function in the same genetic pathway as N in the control of fate determination in bristle cells. To this end, we analyze the penetrance of the double-shaft phenotype observed after depletion of both *esg* and *scrt* in conditions where N activity was deregulated (Figure 1K). Using the *pannier>Gal* driver to express *esg*- and *scrt*-RNAi in the median region of the notum, we observed around 4 duplicated organs per notum when pupae were maintained at 30°C (n=77). This value was significantly reduced when *esg* and *scrt* were downregulated in a N-heterozygous background (*N<sup>ts-1</sup>/N<sup>+</sup>* pupae maintained at 30°C, n=76, p<0.001). Conversely, a significant increase in the number of duplicated organs was observed when *esg* and *scrt* were downregulated in a background where the N activity was increased (*HS>N<sup>intra</sup>* pupae maintained at 30°C, n=63, p<0.001). Since we never observed duplicate sensory organs under these two N deregulation conditions without *esg* and *scrt* downregulation (not shown), we show that *Esg* and *Scrt* are functionally related with N in the control of inner cell fate decisions in



sensory organ cells. Furthermore, our data indicate that *esg* and *scrt* act on inner cell fate determination by counteracting N activity.

*esg and scrt are expressed in the neural branch of the bristle lineage.*

Our analysis shows that *esg* and *scrt* control inner cell fate commitment. To explore whether this control takes place in bristle precursor cells, we studied the expression of *esg* and *scrt* during bristle development. The pattern of Esg was analyzed using an *esg* protein-trap fly line (*esg<sup>p1986</sup>::eGFP*) and specific immunostaining. The *esg* protein-trap line revealed that Esg was absent in pI cells and started to be expressed in pIIb cells but not in their sibling, pIIa cells. Henceforth, Escargot was detected in all pIIb descendants: the glial, pIIb and sheath cells as well as in the neurone (Figure 2A). *In vivo* recordings revealed that GFP fluorescence started to be detected late in pIIb cells, approximately half an hour prior to pIIb division (Movie 1). After division, the fluorescence segregated uniformly between the glial and pIIb cells. Similar observations were obtained during the division of pIIb where the resulting neurone and sheath cells were labelled with the same intensity. The expression pattern of Esg revealed by specific polyclonal antibodies was similar to that observed with the protein-trap line: a nuclear-located signal was clearly observed in pIIb cells and in their descendants (Figure S2).

The expression pattern of *scrt* was similar to that of *esg* as observed by the enhancer trap reporter line (*scrt<sup>439</sup>*): the  $\beta$ -Gal reporter was expressed in pIIb cells and in their descendants, with particularly high levels in neurones (Figure 2B). Furthermore, the low proportion of pIIb staining for  $\beta$ -Gal suggests that, as for *esg*, the onset of the Scrt expression occurred late in these cells.

Altogether, our results shown that, in the bristle lineage, Esg and Scrt are specifically co-expressed in late pIIb cells and in all their descendent cells (Figure 2C). This specific expression in inner cells is compatible with the possibility that *esg* and *scrt* could control neural precursor cell fate in this lineage.

*esg and scrt are necessary and sufficient for pIIb cell fate acquisition.*

To analyse whether Esg and Scrt can control neural precursor cell fate, we monitored precursor cell identity following *esg* and *scrt* downregulation. Identities of pIIb and pIIa cells were assessed by the expression of Tramtrack, a non-neuronal



fate determinant that is expressed specifically in pIIa cells (Audibert et al., 2005). In non-clonal hypomorph *scrt<sup>jo11/jo16</sup>* tissue at 19h APF, sensory clusters were composed of a pair of secondary precursor cells, the anterior-located pIIb and the posterior-located Ttk-positive pIIa cells (Figure 3A, A', arrowheads). In contrast, at similar development time, sensory organs inside *esg* null clones induced in the heteroallelic *scrt<sup>jo11/jo16</sup>* background were composed of two cells, both of them Ttk-positive (Figure 3A, A', asterisks. 14 out of 84 sensory organs analyzed).

In a converse set of experiments, we analysed secondary precursor cell identity after overexpression of *esg*. Identity of pIIb was monitored by *pros* expression. *esg* was overexpressed using a *neuralized>Gal4* promoter that expresses GAL4 in all cells of the mechanosensory organs. As shown in Figure 3C, in control sensory organs at the two-cell stage, only the anterior pIIb cell expressed *pros* just prior their cell division as revealed by the cortical-location of *pros* (see also (Gho et al., 1999)). After overexpression of *esg*, we observed two-cell sensory organs where both cells expressed cortical-located *pros* (Figure 3D). These observations show that the presumptive posterior pIIa cell has acquired a pIIb cell identity after overexpression of *esg*.

These results show that *Esg* and *Scrt* are necessary and sufficient for the maintenance of the pIIb cell fate. As such, downregulation of *esg* and *scrt* leads to a cell transformation where the anterior precursor cell, pIIb, acquires a Ttk-positive pIIa cell fate. This cell transformation then leads to sensory organs composed exclusively of outer cells, with double-shaft external structures (Figure 3B).

*The expression of esg and scrt is related to the acquisition of the pIIb fate.*

We next studied the expression of *Esg* and *Scrt* in conditions where the pIIa/pIIb decision is affected. First, we studied a situation where the pI generates two pIIb cells after down-regulation of *N*. To this end, we used the thermosensitive allele *N<sup>ts-1</sup>* maintained at restrictive temperature. In control two-cell stage sensory organs, only the anterior cell pIIb expressed *esg* ou *scrt* (Figures S3A, S3D). In contrast, in N-hypomorphic conditions, where both cells acquired a pIIb identity, both precursor cells were positive for *Esg* or *Scrt* (Figures S3A' and S3D'). Next, we analyzed the expression of *Esg* and *Scrt* in sensory organs where no pIIb cells were produced by overexpressing the active form of the N-receptor (*N<sup>intra</sup>*). Under these conditions, neither *Esg* nor *Scrt* were expressed (Figures S3B-B' and S3E-E'). Finally,





we analyzed the expression of *Esg* or *Scrt* in cell-cycle arrested pI cells, which leads to their transformation into pIIb (Fichelson and Gho, 2004). Under these conditions, *Esg* and *Scrt* were detected in pI cells, which was never observed in the control situation (Figures S3C-C' and S3F-F').

Taken together, our data show that (i) *esg* and *scrt* are necessary and sufficient to maintain pIIb cell fate; (ii) they genetically interact with N on the control of secondary precursor fate decisions and (iii) the acquisition of a pIIb fate is correlated with the expression of *esg* and *scrt*. As such, these results show that the acquisition of the pIIb fate, a N<sub>off</sub> cell fate, requires *esg* or *scrt* functions.

#### *Escargot, but not Scratch, controls axon guidance*

Since *esg* and *scrt* are expressed in all pIIb descendent cells, we wondered whether they could also control their differentiation. We focused our attention on axonal projections in *esg* null neurones using a clonal strategy that allows us to use the axonal projections of sensory organs outside the clones as internal controls. In normal conditions, neurones from the sensory organs located at each side of the midline harbour axonal projections that follow a medio-lateral direction. These projections were disoriented in sensory organs inside *esg* null clones, and in some cases, we observed axon crossing the midline (arrow in Figure 4A). We also notice that, at a given developmental time, *esg* null neurones have a thinner and shorter axon than wild-type neurones. In control organs at 26h APF, no significant differences in axon length were observed between projections from ipsi- and contra-lateral neurones (Figure 4B, n=20, Mann & Whitney test). In contrast, at a similar developmental time, a significant reduction of about 25% in axon length was observed in mutant neurones inside *esg* null clones, when compared with their contralateral sibling control neurones (Figure 4B, n=18, Mann & Whitney test). Axons crossing the midline were never observed in pupae from the strong heteroallelic combination strain, *scrt<sup>jo11</sup>/scrt<sup>jo16</sup>* (not shown).

We were interested to know whether axon projection impairments observed in *esg* mutant pupae can be also observed during the period of embryogenesis. To this end, we studied axonal projections in the peripheral nervous system of *esg* mutant embryos using 22C10 immunoreactivity. The overall morphology of embryos was indistinguishable from that of wild-type in 95% of *esg<sup>G66B</sup>* null homozygous embryos. However, in 15% of these embryos, we observed that



intersegmental nerves have aberrant projections with axons crossing to the adjacent segment (arrows in Figure S4). As before, no impairment in axon patterning was observed in *scrt* null embryos (not shown)

Taken together, these results indicate that axon patterning was impaired in *esg* mutant neurones during embryogenesis and metamorphosis, the two periods of neurogenesis in the lifecycle of *Drosophila*. In addition, *Scrt* was ineffective in controlling axon guidance. As such, although both *esg* and *scrt* redundantly control fate determination of neural precursor cells, only *esg* is involved in one aspect of neuronal differentiation, namely axon patterning.

*Esg affects axonal projection cell-autonomously.*

We cannot rule out that undetectable levels of expression of these genes are present in neighbouring epithelial cells. As such, the effect on axonal projections observed in *esg* clones could be due to a failure in axon differentiation *per se*, in external clues coming from the epithelium or both. To explore these possibilities, we downregulated *esg* specifically in sensory cells, but not in surrounded epithelial cells, by overexpressing RNAi constructions using cell-specific GAL4 drivers.

Using the *neur>GAL4* driver, RNAi mediated downregulation of *esg*, but not *scrt*, induced similar effect on axon misrouting to those observed in *esg* null clones (Figure 4C, D, arrows). To quantify this phenotype, we counted the number of thoraxes with axonal projections crossing the midline. When *esg* was knocked-down, a significant number of nota presented axon that crossed the midline when compared with control nota (Figure 4E. 26%,  $p < 0.01$ ,  $n = 19$ ). Interestingly, similar impairments of axonal projections were also observed when the construction was driven by an *ELAV* promoter that is expressed in late postmitotic neurones only (Figure 4F, 39 % of nota,  $p < 0.05$ ,  $n = 33$ ). Furthermore, we did not observe significant modifications in the axon patterning after *scrt* RNAi knockdown when driven by *neur* or *ELAV* promoters (Figure 4E and not shown. 1 out of 22 and 6 out of 22 respectively). Finally, no significant modification in axonal projection impairment was observed when both *esg* and *scrt* were knocked-down compared to the single *esg* knockdown, using the *neur* (35%,  $n = 23$ ) or *ELAV* drivers (33%,  $n = 24$ ) (Figure 4E, F).

These results show that specific down-regulation of *esg* in neurones is sufficient to induce modifications in axonal patterning. These data indicate that the



effect of *esg* on axonal patterning is cell autonomous. In addition, since axonal defects observed when *esg* was downregulated in all sensory cells were similar to those observed after *esg* downregulation specifically in neurones, we conclude that early expression of *esg* in bristle precursor cells is not required to control axon patterning.

*Esg affects temporal expression of Pros and ELAV.*

We then asked whether the cell-autonomous effect on axon projections observed after *esg* downregulation could be due to a delay in neural formation or to an alteration in the acquisition of the neuronal identity. To test these two possibilities, we analysed the timing of cell divisions as well as the expression of neural specific markers in *esg* mutant bristle lineages.

The rhythm of cell division was followed *in vivo* in sensory organs located within *esg* null clones. We observed that neither the pattern nor the timing of cell divisions was affected in *esg* null sensory organs when compared to sibling sensory organs located outside the clone (Movie 2).

The acquisition of neuronal identity was monitored using the expression of Pros and ELAV, in the two pIIb descendents, the neurone and the sheath cell. Previous studies have shown that Pros is asymmetrically segregated and inherited by the future neurone during the pIIb division (at about 21h APF at 25°C, (Gho et al., 1999)). Pros then gradually vanishes from the neurone and appears in the sheath cell, where its expression subsequently culminates. In parallel with this switch in the expression of Pros, ELAV is initially detected at low levels in the cytoplasm of both cells and becomes highly expressed in the nucleus of the neurone. Using clonal analysis at 26h APF, we observed strong ELAV and Pros expression respectively in the neurone and the sheath cells of *esg* null sensory organs similar to the situation in control specimens (Figure 5 A, B). However, this expression was not well resolved in mutant organs at earlier developmental time points. Indeed, at 24h APF, while a strong expression of ELAV and Pros was already observed in control neurones and sheath cells respectively, sensory organs inside *esg* null clones still presented low levels of ELAV and Pros, comparable to those observed at 21h APF in control conditions (Figure 5 C and D, asterisks).



Our results indicate that the effects on axon projections observed in *esg* null conditions are associated with a delay both in the switch of *Pros* expression, from neurone to sheath, and in the progressive accumulation of ELAV in neurones.

*Axon misrouting induced after *esg* downregulation involves deregulation of *elav* and *pros* expression.*

We next tested whether the action of *esg* on axon patterning results from an effect on the expression of *elav* and *pros*. To assess the potential involvement of ELAV, we studied neuronal differentiation in *elav* null clones. Sensory organs inside *elav* null clones presented the normal set of terminal cells and *pros* expression was not affected (Figure S5A). Importantly, axon patterning was normal in *elav* null neurones (Figure S5B). Interestingly, while RNAi-mediated *esg* downregulation in neurones induced axon misrouting in 39% of the nota analysed, this value was significantly reduced to 12% (n=22, p<0.02) when *elav* was concomitantly overexpressed (Figure 4F). This phenotypic suppression was not due to a dilution of GAL4 associated with the increase in the number of UAS sequences since no suppression was observed when other UAS constructions, such as UAS-CD8mCherry, were used concomitantly with *esg* RNAi knockdown (Figure 4F). These data strongly indicate that impairments in axon patterning induced after *esg* downregulation rely on deregulation rather than complete silencing of *elav* expression.

In contrast to *elav*, axons failed to develop in 40% of sensory organs inside *pros* null clones (n=24, Figure 5E asterisk). Correlated with axon impairments, *elav* was downregulated in these sensory organs (Figure 5F asterisk). In converse experiments, abnormal axon projections that cross the midline were observed when *pros* was ectopically expressed in neurones (Figure 5G). These data suggest that, although transiently expressed in neurones, a deregulation of *pros* expression impairs neurone differentiation and in particular axon projection development.





## Discussion

Using a combination of genetic and cell biological analyses, we show that *Esg* and *Scrt*, which belongs to the Snail gene superfamily, control inner cell fate commitment and axonal patterning in *Drosophila* sensory organs. Both transcription factors are expressed at early stages in the bristle lineage, particularly, in the sublineage that gives rise to the inner neural cells. Our results indicate that these factors redundantly control the pIIb/pIIa fate decision. The data presented here suggest that these factors interact with *N* and are involved in maintenance of *N<sub>off</sub>* cell fate, i.e. the pIIb fate. In addition, *Esg*, but not *Scrt*, affects terminal neuronal differentiation, including axonogenesis. Axon length and pathfinding were altered in *esg* mutant conditions. Furthermore, the temporal expression of ELAV and Pros, two factors that are expressed in early stages of neurogenesis, was delayed in sensory organs mutant for *esg*. Finally, axon underdevelopment or misrouting were observed after *pros* deregulation and the effects on axonogenesis after *esg* downregulation were suppressed by the neurone-specific overexpression of ELAV. Altogether, these data favour the idea that axon impairments induced after downregulation of *esg* are due to a deregulation of *pros* and *elav*. Our results show that *Esg* and *Scrt* affect neurogenesis by controlling multiples steps in the temporal determination of neurones.

### *Interaction between N and Snail factors.*

We show that 48% of flies harboured sensory organs composed of only outer cells (double-shaft phenotype) when both *esg* and *scrt* were downregulated. This phenotype was not observed in flies in which *esg* or *scrt* were downregulated individually. Double-shaft sensory organs resulted from a cell transformation of pIIb into pIIa cells. Since a significant reduction in the number of adults harbouring double shafts were observed after downregulation of *esg* and *scrt* in a *N*-hypomorph context, we favour the idea that *Esg* and *Scrt* act redundantly to control pIIb cell identity by down-regulating the activity of the *N*-pathway. The precise molecular mechanism involved in this control of *N*-activity is unknown. Since secondary precursor cell determination is a rapid process (occurring during the first 30' after birth, (Remaud et al., 2008)) and the onset of the *esg* and *scrt* expression occurred in late pIIb cells, we believe that *esg* and *scrt* are not involved in the determination of



the pIIb identity *per se*, but rather, in the maintain of this cell fate. As such, we propose that Esg and Scrt lock the pIIb identity by absorbing any variation of the N-activity in the normally N<sub>off</sub> pIIb precursor cell.

*Esg and Scrt are involved in neural commitment and differentiation.*

To our knowledge, this is the first report showing that Esg and Scrt act redundantly on the control of cell fate. A common action of these two distantly related members of the Snail superfamily suggests that ancestors of Snail factors were already involved in the control of precursor cell fate identity. Interestingly, *esg* is expressed in several stem cell types in *Drosophila*, in particular in histoblasts, in intestinal stem cells and in male germ stem cells (Fuse et al., 1994; Micchelli and Perrimon, 2006; Streit et al., 2002). Several studies performed in these cell types have however shown that the lack of *esg* does not affect stem cell fate (Hayashi, 1996). It will be interesting to know whether *scrt* is expressed in these stem cells and plays a same redundant role similar to the one described here in neural progenitor cells. Since members of the Snail and Scrt family are also expressed in neural progenitors in vertebrates (Itoh et al., 2013; Viece et al., 2013; Zander et al., 2014), our results are likely to be of general relevance and may help understand the mechanisms underlying vertebrate neurogenesis.

In agreement with previous studies highlighting the involvement of members of the Snail superfamily in neurogenesis (Ashraf et al., 1999; Ashraf and Ip, 2001; Cai et al., 2001; Hartl et al., 2011; Roark et al., 1995; Yang et al., 2010), we show here that axonal projections were impaired in the peripheral nervous system of *esg* mutant embryos as well as adult sensory organs. Our data indicate that *esg* acts cell autonomously on neuronal differentiation, an action that is independent of the function of *esg* on precursor cell identity. As such, Snail-related factors are regulators of neuronal differentiation, acting cell-autonomously in different neuronal types and throughout development. Interestingly, Esg and its mammalian orthologue Slug both trigger the expression of neuronal markers and the adoption of neuronal features when expressed in cultured mammalian proneural cells (Yang et al., 2010). These observations highlight the strong conservation of Snail-related factors and the similarities in neuronal differentiation mechanisms between insects and mammals.



*Esg regulates expression of genes involved in terminal differentiation of neurones.*

Current evidence indicates that Snail factors act on multiples effectors and their action depend on the cellular context (Ashraf et al., 1999; Ashraf and Ip, 2001; Cai et al., 2001; Yang et al., 2010). For instance, in sensory organs located on antenna and maxillary palps, *esg* is downstream of *pros* in the cascade leading to the CO<sub>2</sub> sensitive neuronal differentiation (Hartl et al., 2011). In contrast, in mechanosensory organs, we observed that *esg* is upstream of *pros* since, in *esg* null clones, the expression of *pros* was impaired. This suggests that Snail-related factors are linked to neuronal cell determinants by reciprocal relationships and, these inter-relations are biased one way or another BY the cellular context.

ELAV and Pros are considered as key factors involved in neural differentiation (Colonques et al., 2011; Koushika et al., 2000; Manning and Doe, 1999). ELAV, which encodes an RNA-binding protein involved in RNA alternative splicing (Koushika et al., 1996), is specifically expressed in all post-mitotic neurones from the earliest stages of their differentiation. ELAV is involved in the transition between stem to progenitor cells, and it is also required for proper neuronal differentiation and for synaptic plasticity (Hilgers et al., 2012; Simionato et al., 2007). Seminal experiments have shown that Pros is involved in neurite outgrowth (Manning and Doe, 1999; Vaessin et al., 1991). Interestingly, it has been reported that *pros* is transiently expressed in the nucleus of many types of neuroblasts (Doe et al., 1991; Kauffmann et al., 1996; Vaessin et al., 1991). This transient expression of *pros* seems to be essential either for the entry into a quiescent state or to ensure a precise timing for neuronal differentiation (Colonques et al., 2011). In bristle sensory organs, *pros* is also transiently expressed in neurones. In *esg* mutants, we observed a deregulation of the expression of *pros* and *elav* associated with the presence of impaired axonal projections. In addition, gain- and loss-of-functions of *pros* induced impairments in axonal projections. In contrast, although the *esg* phenotype of axon misrouting was suppressed following *elav* overexpression, we failed to observe axon patterning defects in *elav* null clones. We therefore favour the idea that deregulation of *pros* expression is a key step in the mechanism linking the lack of *esg* to axonal patterning defects.



*Esg and Scrt are involved in cell fate decisions reminiscent of classical cell differentiation*

Esg and Scrt are expressed in pIIb cells and their descendants. Early in the bristle lineage, Esg and Scrt act redundantly to maintain secondary precursor cell identities while Esg, but not Scrt, is involved in late neuronal differentiation in the bristle lineage. Interestingly, *esg* and *scrt* were expressed following a normal timing in cell cycle-arrested pI cells (Fig. 2C). This shows that the expression of *esg* and *scrt* is not triggered by a cell cycle related mechanism. As such, it seems that the expression of *esg* and *scrt* predates the program of cell divisions that pI cells undergo. We speculate that early expression of these factors are related to intrinsic capabilities of progenitor cells to differentiate ultimately into sensory cells (Galliot and Quiquand, 2011; Pearson and Doe, 2003). We propose that ancestors of Snail factors were involved in the adoption of neural features by primary precursor cells, like classical cell differentiation, independently of the pattern of cell divisions that these cells undergo.





## Experimental Procedures

### *Fly stocks*

Fly crosses, embryonic and larval development were carried out at 25°C except where otherwise stated.

Using the GAL4/UAS expression system (Brand and Perrimon, 1993), the following constructions were expressed: UAS-cd8::mCherry; UAS-*elav* (gift from Matthias Soller); UAS-*pros* (gift from V. Rodrigues); UAS-histoneH2B::rfp (H2B::RFP) (Bellaiche et al., 2001); UAS-*tribbles*; UAS-*esg* (gift from Shigeo Hayashi) UAS-*scrt*<sup>RNAi</sup> (No 105201, VDRC) and UAS-*esg*<sup>RNAi</sup> (No 9794 and 9793, VDRC). As drivers, we used the *neuralized*<sup>p72</sup>-GAL4 (*neur*>GAL4); the *elav*<sup>L</sup>>Gal4 line (a Gal4 construction driven by *elav* promoter located on the third chromosome, Bloomington), *pannier*>Gal4 and *HS*-Gal4. The protein-trap line *esg*<sup>P01986</sup>::GFP (FlyTrap) and the enhancer trap *scrt*>*lacZ* (Bloomington) were used to monitor *esg* and *scrt* expression respectively. The *w*; *esg*<sup>G66B</sup> / *TM6Tb* *wg-lacZ* and *w*; *scrt*<sup>jo11</sup> / *TM6* *lacZ* lines were used to obtain *esg* and *scrt* null mutant embryos respectively identified by the lack of β-gal staining.

Somatic clones were obtained by means of the FLP/FRT recombination system (Xu and Rubin, 1993) using an Ubx-FLP line. The *w*; *FRT40A* *esg*<sup>G66B</sup>/*CyO* line was used to generate *esg* null clones. The *FRT82B* *pros*<sup>17</sup>/*TM6B* *tb* (Reddy and Rodrigues, 1999) was used to generate *pros*-null clones and the *FRT19A* *elav*<sup>e5</sup>/*FM7* was used to generate *elav*-null clones. Escapers of the strong allelic combination *scrt*<sup>jo11</sup>/*scrt*<sup>jo16</sup> (gift from E. Biers) were used to analyse the *scrt* mutant phenotype.

To transform pI cells into pIIb cells, pI was cell-cycle-arrested by down-regulation of Cdk1, which was induced by the overexpression of Tribbles (Fichelson and Gho, 2004). Transformation of pIIb into pIIa was realised by ectopic expression of the active form of N (N<sub>intra</sub>) via a heat-shock promotor. White pupae were collected, kept for 17h at 25°C and then heat-shocked for 1h at 37°C. We dissected 1h30 after heat-shock. Transformation of pIIa into pIIb was realised by downregulation of N using a thermosensitive allele of N (*N<sup>ts-1</sup>*). Fly crosses, embryonic and larval development were carried out at 18°C. White males pupae were then collected, kept for 17h at 25°C and then at 30°C for 1h before dissection. To impair PCP pathway, females carrying the null allele *dsh*<sup>1</sup> were crossed with *esg*::GFP or *scrt*>*LacZ* males. Male white pupae were then collected and dissected at 19h APF.



### *Immunohistology.*

Pupal nota were dissected between 17 h and 35 h APF and processed as previously described (Gho et al., 1996). Primary antibodies were: mouse anti-Cut (DSHB, 1:500); rat anti-ELAV (DSHB, 1:10); rat anti-Esg (gift from S. Hayashi, 1:500); mouse anti-Futsch (22C10) (DSHB, 1:100); rabbit anti- $\beta$ -Galactosidase (Cappel, 1:500); rabbit anti-GFP (Interchim, 1:1000); mouse anti-Pros (gift from C. Doe, 1:5); rabbit anti-Ttk (gift from F. Schweisguth, 1:300); rat anti-Su(H) (gift from F. Schweisguth 1:500); rabbit anti-Pdm1 (gift from T. Pr  at, 1:2000). Alexa 488- and 568-conjugated secondary anti-mouse, anti-rat, anti-rabbit, anti-guinea pig were purchased from Molecular Probe and used at 1:1000. Cy5 conjugated antibodies anti-mouse, -rat or -rabbit were purchased from Promega and were used at 1:2000.

To perform embryo immunostaining, flies were kept in a cage to lay during 5h40 at 25  C. Adult flies were then removed and deposited eggs were store at 18  C for 20h40. Embryos were fixed for 5 min in heptane: formaldehyde 37% (1:1) and devitellinised in heptane:methanol (1:1) with strong agitation and washed in methanol. Embryos were gradually rehydrated (PBS/methanol 1:1, then PBS only) and washed in PBS + 0,1% Triton. Immunostaining was performed as previously.

Images were obtained on an Olympus BX41 fluorescence microscope (40X or 60X immersion oil objective) equipped with a CoolSnapHQ2 camera driven by Metaview software (Universal Imaging). Images were processes with NIH. When required, images were reconstituted using the MosaicJ ImageJ plugin. Axon length was measured using NeuronJ ImageJ plugin.

### **Authors Contributions.**

P.F. performed initial exploring data. A.R. and M.G. conceived, designed and performed main set of experiments. A.R., A.A., S.L. and M.G. analyzed results. F.S. provided technical assistance. A.R., P.F. and M.G. wrote the manuscript.

### **Acknowledgments.**

We specially thank Heather McLean and Yohanns Bellaiche for critical reading of the manuscript, Carine Torset for technical help, the fly community for fly strains and antibodies. Anne Ramat was supported by grant from "Fondation pour la Recherche Medicale" (FDT20130928191).



## References

- Ashraf, S.I., Hu, X., Roote, J., and Ip, Y.T. (1999). The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis. *EMBO J* 18, 6426-6438.
- Ashraf, S.I., and Ip, Y.T. (2001). The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. *Development* 128, 4757-4767.
- Audibert, A., Simon, F., and Gho, M. (2005). Cell cycle diversity involves differential regulation of Cyclin E activity in the *Drosophila* bristle cell lineage. *Development* 132, 2287-2297.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2009). Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet* 25, 248-252.
- Bellaiche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J.A., Brand, A.H., and Schweisguth, F. (2001). *Frizzled* regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 3, 50-57.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brown, G., Hughes, P.J., and Michell, R.H. (2003). Cell differentiation and proliferation--simultaneous but independent? *Exp Cell Res* 291, 282-288.
- Cai, Y., Chia, W., and Yang, X. (2001). A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J* 20, 1704-1714.
- Colonques, J., Ceron, J., Reichert, H., and Tejedor, F.J. (2011). A transient expression of *Prospero* promotes cell cycle exit of *Drosophila* postembryonic neurons through the regulation of *Dacapo*. *PLoS One* 6, e19342.
- Doe, C.Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D.M., and Scott, M.P. (1991). The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 65, 451-464.
- Fichelson, P., and Gho, M. (2003). The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of *Drosophila*. *Development* 130, 123-133.
- Fichelson, P., and Gho, M. (2004). Mother-daughter precursor cell fate transformation after *Cdc2* down-regulation in the *Drosophila* bristle lineage. *Dev Biol* 276, 367-377.



Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev* 8, 2270-2281.

Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1996). Determination of wing cell fate by the *escargot* and *snail* genes in *Drosophila*. *Development* 122, 1059-1067.

Galliot, B., and Quiquand, M. (2011). A two-step process in the emergence of neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34, 847-862.

Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584.

Gho, M., Lecourtois, M., Geraud, G., Posakony, J.W., and Schweisguth, F. (1996). Subcellular localization of Suppressor of Hairless in *Drosophila* sense organ cells during Notch signalling. *Development* 122, 1673-1682.

Grau, Y., Carteret, C., and Simpson, P. (1984). Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of *Snail*, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 108, 347-360.

Guo, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of *Numb* and *Notch*. *Neuron* 17, 27-41.

Guruharsha, K.G., Kankel, M.W., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 13, 654-666.

Hartenstein, V., and Posakony, J.W. (1990). Sensillum development in the absence of cell division: the sensillum phenotype of the *Drosophila* mutant *string*. *Dev Biol* 138, 147-158.

Hartl, M., Loschek, L.F., Stephan, D., Siju, K.P., Knappmeyer, C., and Kadow, I.C. (2011). A new *Prospero* and *microRNA-279* pathway restricts CO<sub>2</sub> receptor neuron formation. *J Neurosci* 31, 15660-15673.

Hayashi, S. (1996). A *Cdc2* dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development* 122, 1051-1058.

Hilgers, V., Lemke, S.B., and Levine, M. (2012). ELAV mediates 3' UTR extension in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* 26, 2259-2264.

Itoh, Y., Moriyama, Y., Hasegawa, T., Endo, T.A., Toyoda, T., and Gotoh, Y. (2013). Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nat Neurosci* 16, 416-425.





Kauffmann, R.C., Li, S., Gallagher, P.A., Zhang, J., and Carthew, R.W. (1996). Ras1 signaling and transcriptional competence in the R7 cell of *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 2167-2178.

Kim, H.S., Jeong, H., Lim, S.O., and Jung, G. (2013). Snail inhibits Notch1 intracellular domain mediated transcriptional activation via competing with MAML1. *Biochem Biophys Res Commun* 433, 6-10.

Koushika, S.P., Lisbin, M.J., and White, K. (1996). ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. *Curr Biol* 6, 1634-1641.

Koushika, S.P., Soller, M., and White, K. (2000). The neuron-enriched splicing pattern of *Drosophila* erect wing is dependent on the presence of ELAV protein. *Mol Cell Biol* 20, 1836-1845.

LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221, 195-205.

Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., and Bel-Vialar, S. (2012). NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 32, 2596-2607.

Lai, E.C., and Orgogozo, V. (2004). A hidden program in *Drosophila* peripheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity. *Dev Biol* 269, 1-17.

Lai, S.L., Miller, M.R., Robinson, K.J., and Doe, C.Q. (2012). The Snail family member Worniu is continuously required in neuroblasts to prevent Elav-induced premature differentiation. *Dev Cell* 23, 849-857.

Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* 5, 139-148.

Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.

Lim, S.O., Kim, H.S., Quan, X., Ahn, S.M., Kim, H., Hsieh, D., Seong, J.K., and Jung, G. (2011). Notch1 binds and induces degradation of Snail in hepatocellular carcinoma. *BMC Biol* 9, 83.

Manning, L., and Doe, C.Q. (1999). Prospero distinguishes sibling cell fate without asymmetric localization in the *Drosophila* adult external sense organ lineage. *Development* 126, 2063-2071.



Micchelli, C.A., and Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439, 475-479.

Morel, V., Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression. *Dev Genes Evol* 213, 65-72.

Morin, X., and Bellaiche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* 21, 102-119.

Nakayama, H., Scott, I.C., and Cross, J.C. (1998). The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 199, 150-163.

Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.

Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-450.

Pearson, B.J., and Doe, C.Q. (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* 425, 624-628.

Reddy, G.V., and Rodrigues, V. (1999). Sibling cell fate in the *Drosophila* adult external sense organ lineage is specified by prospero function, which is regulated by Numb and Notch. *Development* 126, 2083-2092.

Remaud, S., Audibert, A., and Gho, M. (2008). S-phase favours notch cell responsiveness in the *Drosophila* bristle lineage. *PLoS One* 3, e3646.

Roark, M., Sturtevant, M.A., Emery, J., Vaessin, H., Grell, E., and Bier, E. (1995). *scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev* 9, 2384-2398.

Simionato, E., Barrios, N., Duloquin, L., Boissonneau, E., Lecorre, P., and Agnes, F. (2007). The *Drosophila* RNA-binding protein ELAV is required for commissural axon midline crossing via control of commissureless mRNA expression in neurons. *Dev Biol* 301, 166-177.

Streit, A., Bernasconi, L., Sergeev, P., Cruz, A., and Steinmann-Zwicky, M. (2002). *mgm 1*, the earliest sex-specific germline marker in *Drosophila*, reflects expression of the gene *esg* in male stem cells. *Int J Dev Biol* 46, 159-166.



Usui-Ishihara, A., Ghysen, A., and Kimura, K. (1995). Peripheral axonal pathway and cleaning behavior are correlated in *Drosophila microchaetes*. *Dev Biol* 167, 398-401.

Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1991). *prospero* is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*. *Cell* 67, 941-953.

Vieceli, F.M., Simoes-Costa, M., Turri, J.A., Kanno, T., Bronner, M., and Yan, C.Y. (2013). The transcription factor chicken *Scratch2* is expressed in a subset of early postmitotic neural progenitors. *Gene Expr Patterns* 13, 189-196.

Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-1237.

Yan, B., Memar, N., Gallinger, J., and Conradt, B. (2013). Coordination of cell proliferation and cell fate determination by CES-1 snail. *PLoS Genet* 9, e1003884.

Yang, D.J., Chung, J.Y., Lee, S.J., Park, S.Y., Pyo, J.H., Ha, N.C., Yoo, M.A., and Park, B.J. (2010). *Slug*, mammalian homologue gene of *Drosophila escargot*, promotes neuronal-differentiation through suppression of *HEB/daughterless*. *Cell Cycle* 9, 2789-2802.

Zander, M.A., Burns, S.E., Yang, G., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2014). Snail coordinately regulates downstream pathways to control multiple aspects of Mammalian neural precursor development. *J Neurosci* 34, 5164-5175.



## Figure Legends

### Figure 1. *Esg* and *Scrt* redundantly control inner cell fates commitment.

(A-D) *Esg* and/or *Scrt* were depleted in the medio-dorsal thorax by expressing RNAi constructs using a *pannier*>Gal4 driver at 25°C. Details of an adult thorax from control (A), *esg* RNAi (B), *scrt* RNAi (C) and double *esg/scrt* RNAi (D) flies. White arrows show double-shaft sensory organs. Control sensory organs (E) and after downregulation of both *esg* and *scrt* by RNAi (F-F"). Outer cells were identified by Pdm1-, sheath cell by Pros- and neurones by ELAV-immunoreactivity respectively. Asterisks in F-F" sensory organs composed by outer cells only. (G-H") Sensory organs in *esg* mutant clones induced in a *scrt* heteroallelic background. (G) Details of an adult thorax showing sensory organs with a double-shaft (arrows and inset). (H-H") *esg* clone were detected by the absence of GFP (blue, blue line shows clonal border). Sensory cells were identified by Cut-, socket cells by Su(H)-immunoreactivity respectively. Asterisks show sensory organs harbouring double socket cells. (I) Detail of a thorax after ectopic expression of *Scrt* (*HS>scrt* pupae, heat-shocked 37°C for 60 min at 16h30 APF). (J-J") Sensory organ cells after overexpression of *scrt*. Sensory organ cells were identified by Cut-; neurones by Elav- and outer cells by Pdm1-immunoreactivity respectively. Asterisks show sensory organs devoid of Pdm-1 positive outer cells. Pupae in E, F, H and J at 30h APF. (K) Genetic interaction between *esg*, *scrt* and *N*. Box-plot of number of duplicated external cells *per* notum in females. *Esg* and *Scratch* were depleted in the dorsal thorax by expressing RNAi constructs using the *pannier*>Gal4 driver at 30°C alone (middle blot), in a *N* loss-of-function background (*N<sup>ts1</sup>/+*, left blot) and in a *N* gain-of-function background (*HS>N<sup>intra</sup>*, right blot). p-values of Student test (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

### Figure 2. *esg* and *scrt* are expressed in the neural sublineage of the bristle cells.

Expression pattern of *Esg* (A, protein-trap *esg::GFP* line) and *Scrt* (B, enhancer trap *scrt>lacZ*) at consecutive stages of development. Sensory cells were identified by the expression of Cut-immunoreactivity. so, socket cell; sf, shaft cell; n, neurone; sh, sheath cell; g, glial cell. (C) Schematic tree of the bristle lineage indicating the





period where pictures in A and B were taken (dashed lines). In green, expression of *esg* or *scrt*. APF, after pupal formation.

**Figure 3. *esg* and *scrt* are necessary and sufficient for pIIb cell fate.**

(A-B) *esg* and *scrt* downregulation induce a pIIb to pIIa cell transformation. (A) *esg* clone (detected by the absence of GFP in blue, white line shows clonal border) in *scrt* heteroallelic background at 18h APF. Sensory cells were identified by Cut-immunoreactivity (red), Ttk immunoreactivity in green and in inverse fluorescence (A'). Arrows show control two-stage sensory organs with only one ttk-positive cell. Asterisks show two-cell stage sensory organs where both cells were ttk-positive. (B) Schematic tree of the bristle lineage following *esg* and *scrt* downregulation. (C-D) Overexpression of *esg* is sufficient to induce a pIIb to-pIIa cell transformation. Pros-expression in sensory organs at the two-cell stage in control (C) and following overexpression of *esg* (D, *neur>esg*).

**Figure 4. *Esg* controls axon patterning cell-autonomously.**

(A) Axonal projections (22C10 staining, green) at 28h APF in an *esg* null clone (detected by the absence of GFP in blue and delimited by a white line). The right border of the clone delimits the midline (red vertical bar). Note that axons are shorter and thinner compared to control. The large red arrow shows a mutant axon crossing the midline. (B) Box-plot on the left depicts the ratio between axon length of neurones in sensory organs located in one side of the midline compared to their counterpart on the other side. Box-plot on the right shows the ratio between the axon length of neurones inside *esg* null clones versus that of the contra-lateral control counterpart. p-values of two-tailed Mann-Whitney test (\*\*  $p < 0.01$ ). (C-D) Neurones immunostained with 22C10 antibodies (black) in control (C) and *esg* knockdown (D) nota. *Esg* was depleted in sensory organ cells after specific expression of RNAi constructions using the *neur>Gal4* driver. Arrow shows an axon crossing the midline. (E, F) Quantification of axonal patterning defects following RNAi-mediated downregulation of *esg* and/or *scrt* in all cells of the lineage (*neur>Gal4*, in E) or specifically in neurones (*elav>Gal4*, in F). Axons crossing the midline were used as a hallmark for axon misrouting defects. Note in (F) that neuronal-specific overexpression of *Elav* suppressed the axonal misrouting



phenotype induced by *esg* downregulation. p-values of Chi<sup>2</sup> test are indicated as follows: NS p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0,01).

**Figure 5: Esg-dependent deregulation of Pros and ELAV expression are associated with axon patterning defects.**

Expression of (A, C) Pros (green) and (B, D) ELAV (green) in pupae at 26h APF (A, B) and 24h APF (C,D). In (A-D), the *esg* null clones (detected by the absence of GFP in blue) is delimited by a white line. Midline denoted by a red horizontal line. (E, E') *pros*<sup>17</sup> null clone detected by the lack of GFP staining (blue, delimited by a white line). Neurones (red) and axones (green) were detected by *elav* and 22C10 immunostaining respectively. The red arrow shows a *pros*-null neurone that has an underdeveloped axon projection associated with a low level of ELAV expression. (H) Overexpression of *pros* in neurones, using an *elav* promoter. Arrows show an axon crossing the midline (indicated by a red vertical line). Pupae at 28h APF. Axones were revealed by 22C10-immunoreactivity.



## Supplemental Information

### Figure S1. Overexpression of *esg* induced outer to inner cell transformation.

(A). Details of a thorax after ectopic expression of *esg* (*HS>esg* pupae, heat-shocked 37°C for 60 min at 16h30 APF) Note the absence of bristles at the external level. (B-B'') Sensory organ cells after overexpression of *esg* at 28h APF. Outer cells were identified by Pdm1-, inner cells were identified by ELAV- and Pros-immunoreactivity. Asterisks show sensory organs devoid of Pdm-1 positive outer cells.

### Figure S2. Expression pattern of *esg* in the bristle cell lineage.

Expression pattern of *esg* at successive stages of development revealed by specific antibodies (green and black in top and bottom panels respectively). Cells from the bristle lineage were identified by  $\beta$ -Gal- immunoreactivity (in red) in *neuralized<sup>A101</sup>>lacZ* pupae. so, socket cells; sf, shaft cells; n, neurones; sh, sheath cells; g, glial cell.

### Figure S3. *Esg* and *Scrt* expression is associated with pIIb cell identity.

(A-C') *Esg*-expression in sensory clusters in control specimens (A, B, C), in a *N*-hypomorph mutant (A', *N<sup>ts</sup>* pupae maintained at 30°C from 17h APF), in a *N*-overexpressing specimen (B', *HS-N<sup>intra</sup>* pupae, heat shocked 37°C for 60 min at 17h30 APF and dissected 24h APF) and in a cell-cycle-arrested pI cell that acquired a pIIb identity (C'). Cells from sensory organs were identified by Cut-immunoreactivity or YFP expression (in *neur>H2B::YFP* pupae). Outer cells were identified by Pdm1-immunoreactivity. *Esg* was monitored using the protein-trap line *esg::GFP* (A-B') and immunoreactivity (C,C') (D-F') *Scrt*-expression was monitored using the enhancer-trap line *scrt>lacZ*.  $\beta$ -Gal staining of *scrt>lacZ* pupae (green) in sensory clusters in control specimens (D, E, F), in a *N*-hypomorph mutant (D', *N<sup>ts</sup>* pupae maintained at 30°C from 17h APF), in a *N*-overexpressing specimen (E'), *HS-N<sup>intra</sup>* pupae, heat shocked 37°C for 60 min at 17h30 APF and dissected 24h APF) and in a cell-cycle-arrested pI cell that acquired a pIIb identity (F'). Cells from sensory organs were identified by Cut-immunoreactivity or YFP expression (in *neur>H2B::YFP* pupae). Outer cells were identified by Pdm1-immunoreactivity.



**Figure S4. Esg controls axon patterning in embryos.**

(A-D) Whole embryo (left) and a close-up view (right) of control (A, B) and *esg* null mutant (C, D) from stage 16. In 15% of mutant embryos, axons (green) were misrouted and crossed from one segment to the adjacent one (white arrow). Neuronal marker ELAV in red. *esg* heterozygous control embryos were identified by the expression of  $\beta$ -Gal in blue.

**Figure S5. Axon patterning was not affected in *elav*<sup>e5</sup> null clones.**

*elav*<sup>e5</sup> null clone detected by the lack of GFP staining (blue), limits are shown by a white (overlay image) and black (negative fluorescent) line. Axons are revealed by 22C10 immunostaining (alone and green in the overlay panel) (A). The red arrow indicates sensory organs mutant for *elav*. Note that axonal projections are not affected in this context.





Figure 1

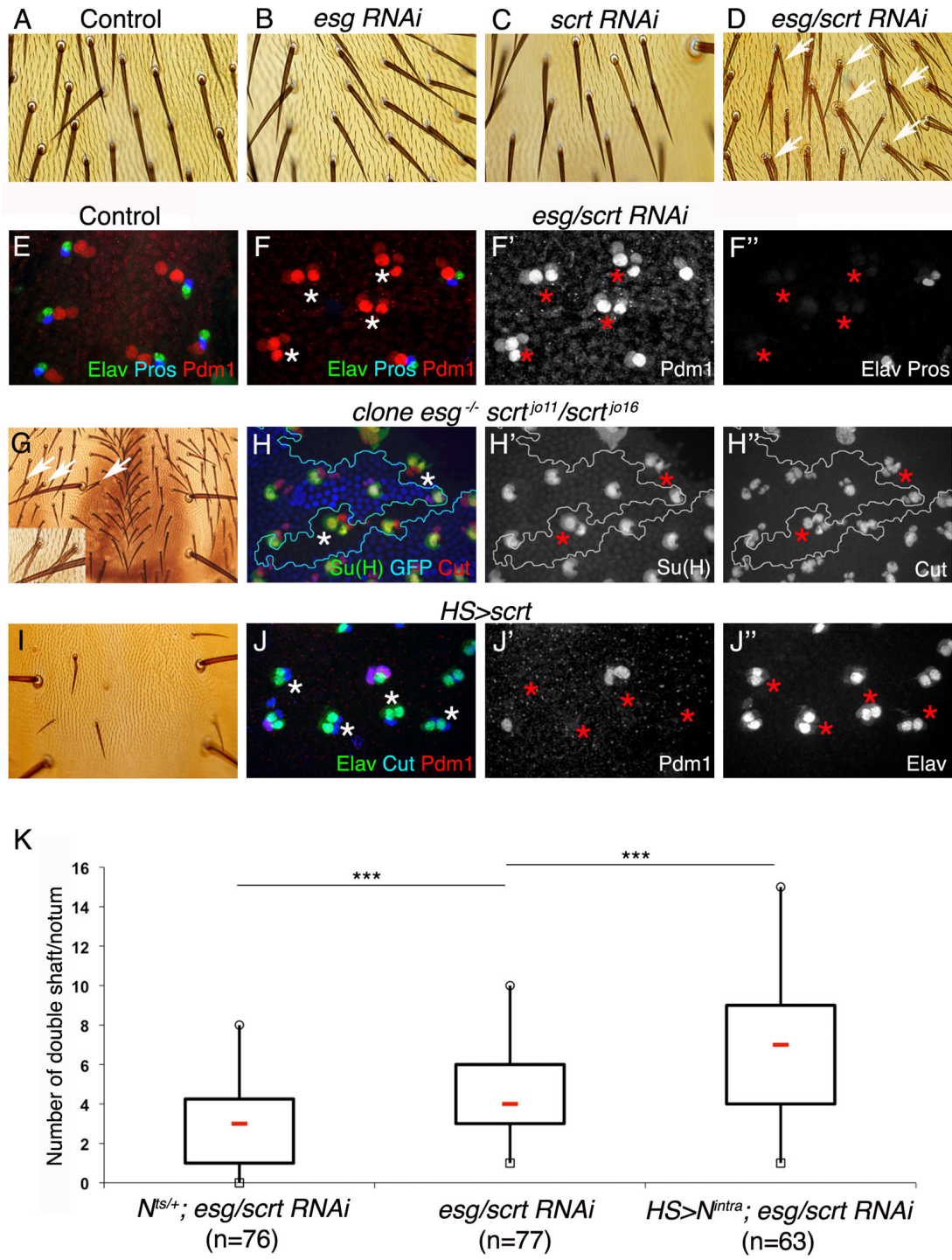




Figure 2

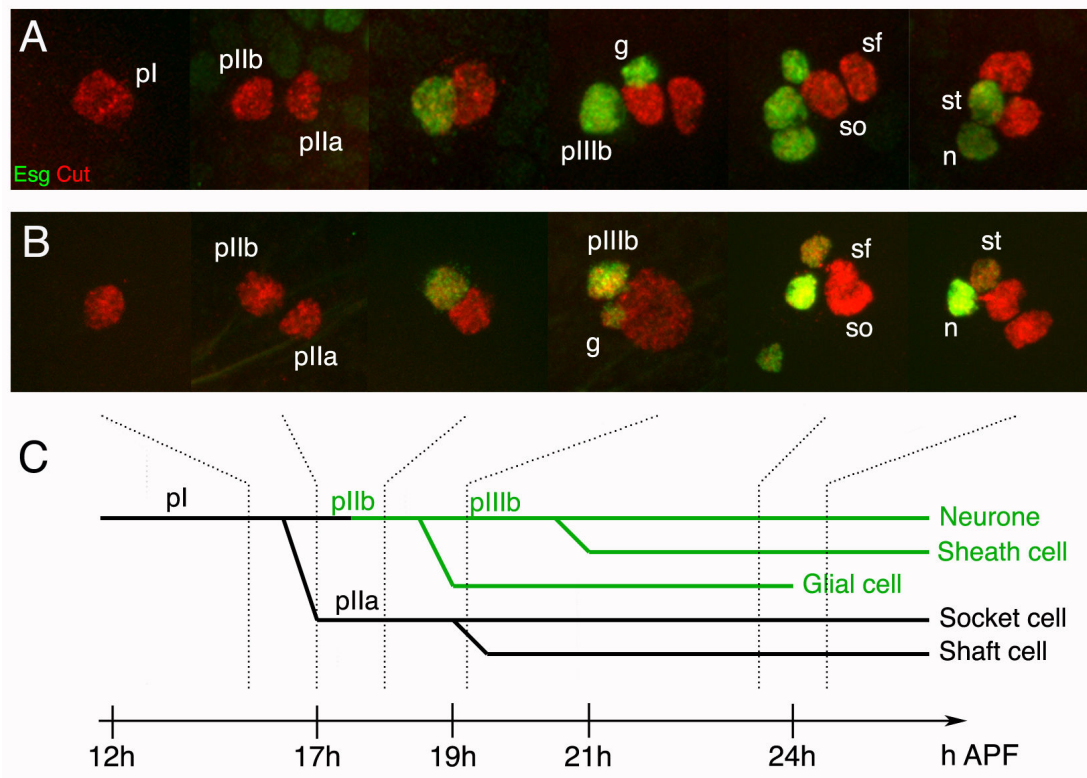




Figure 3

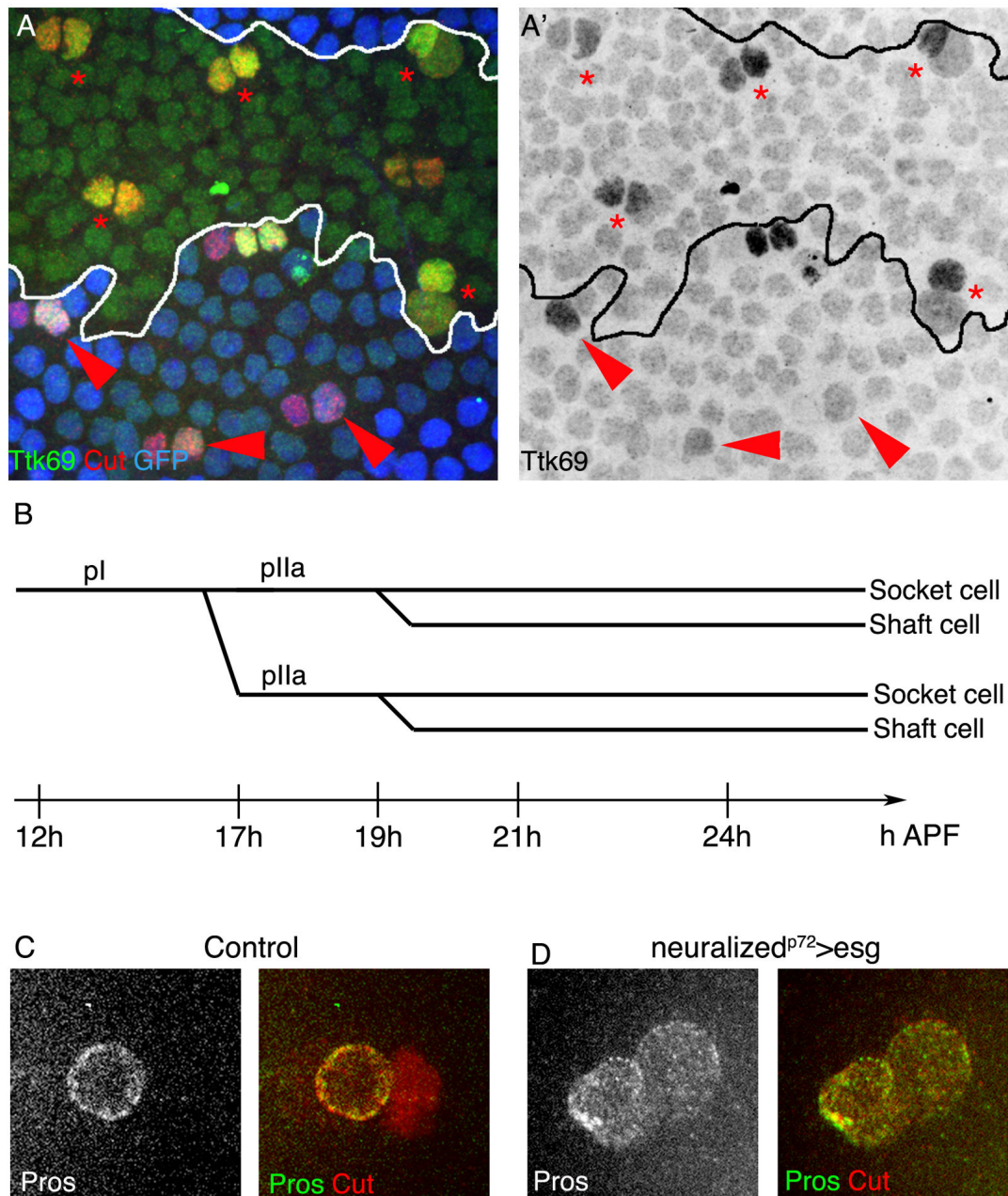






Figure 4

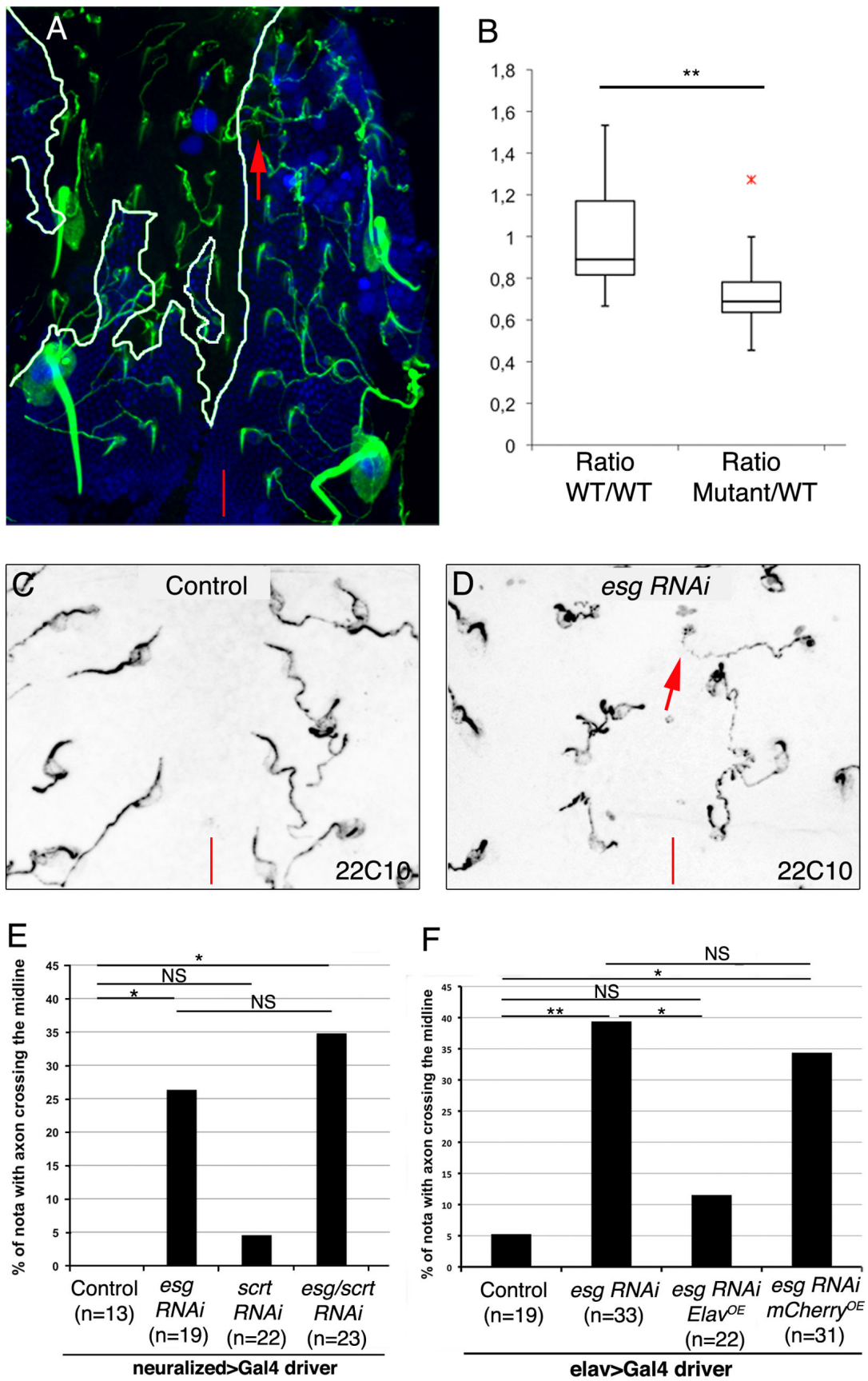






Figure 5

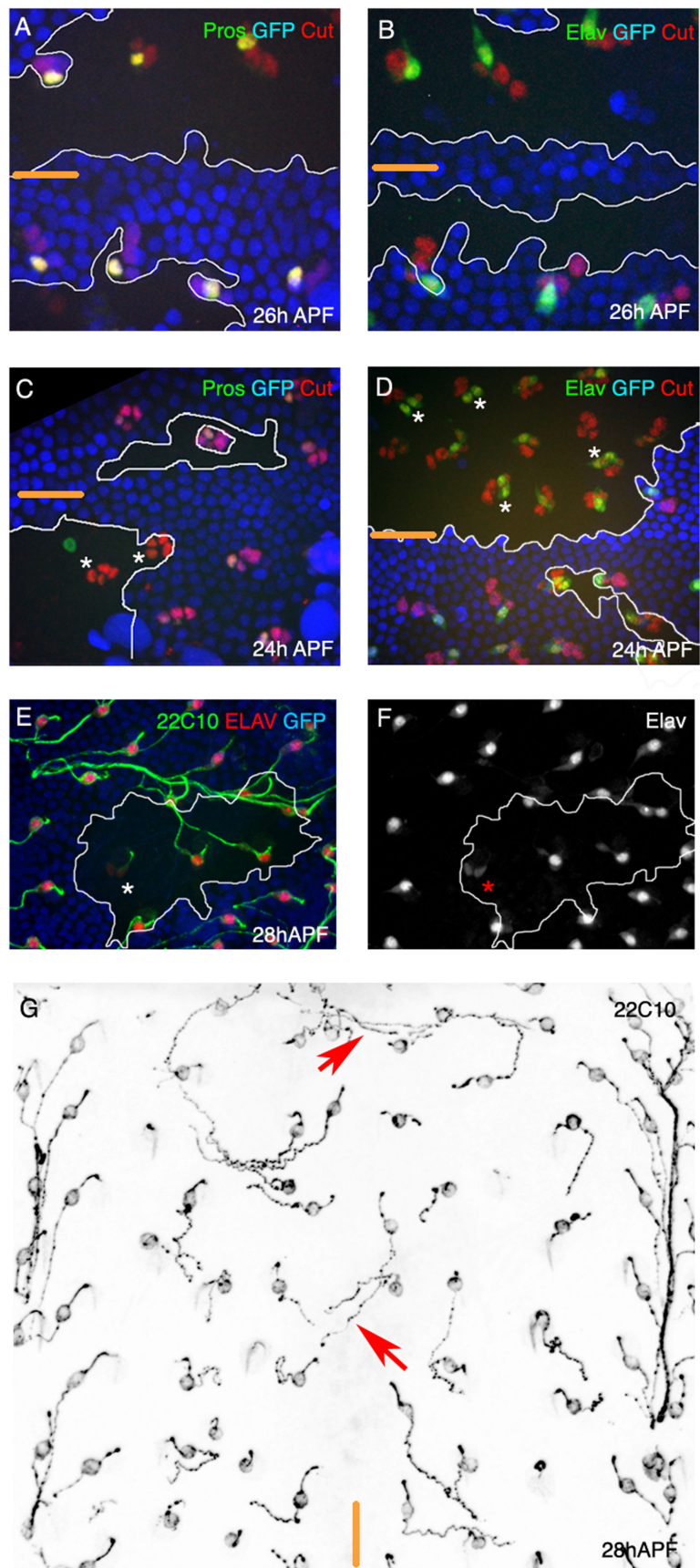




Figure S1

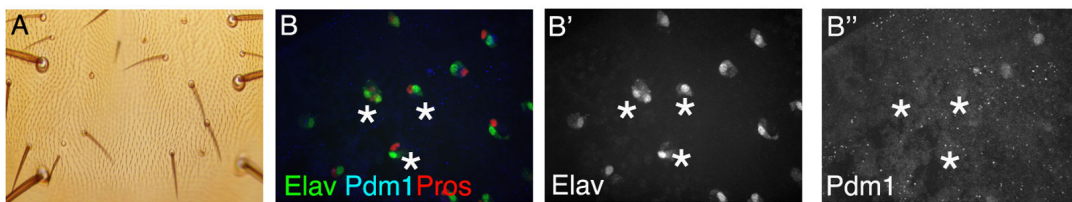




Figure S2

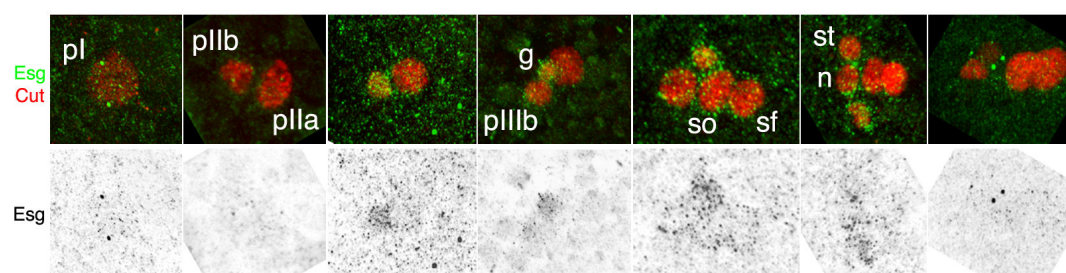




Figure S3

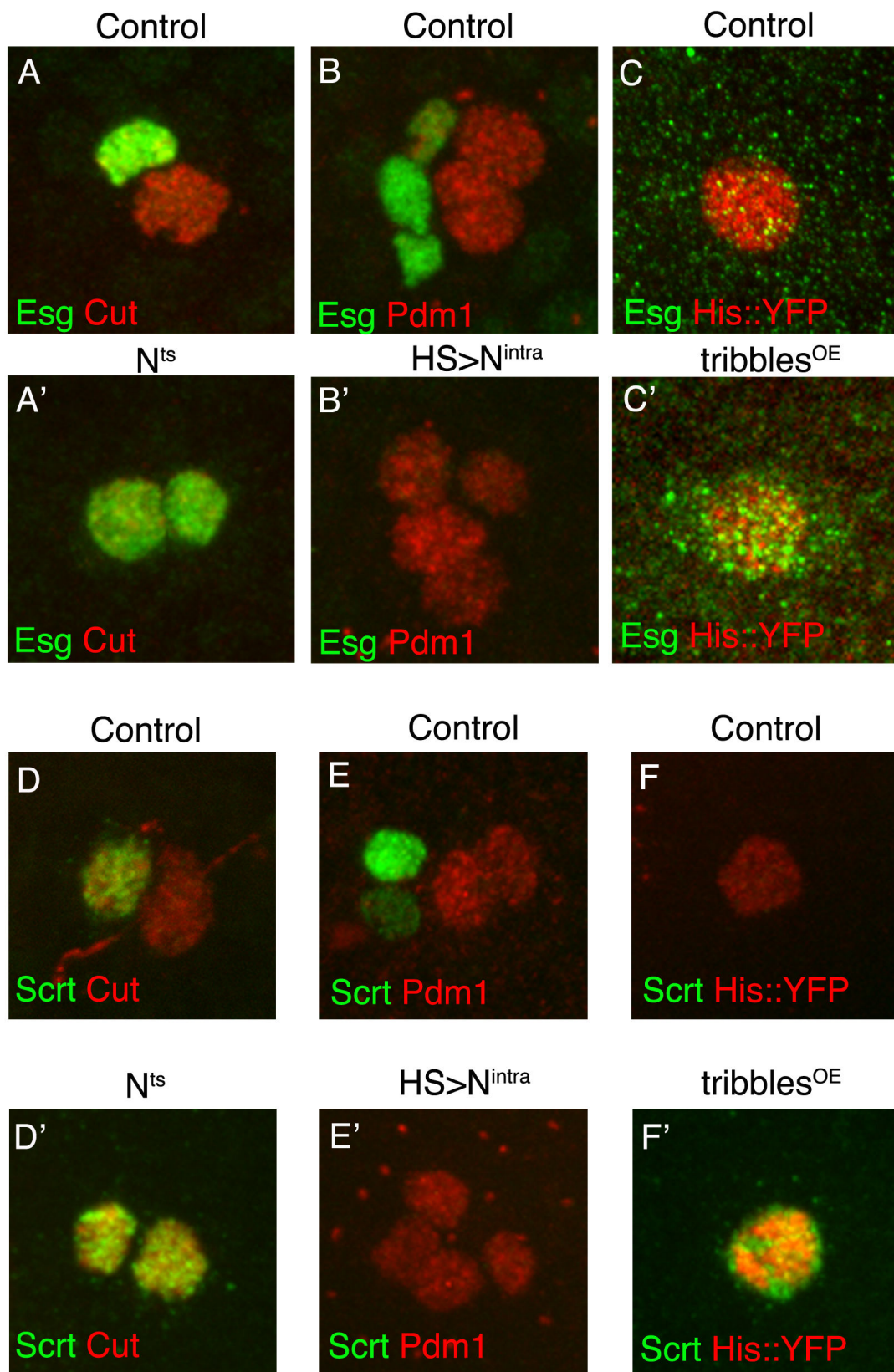






Figure S4

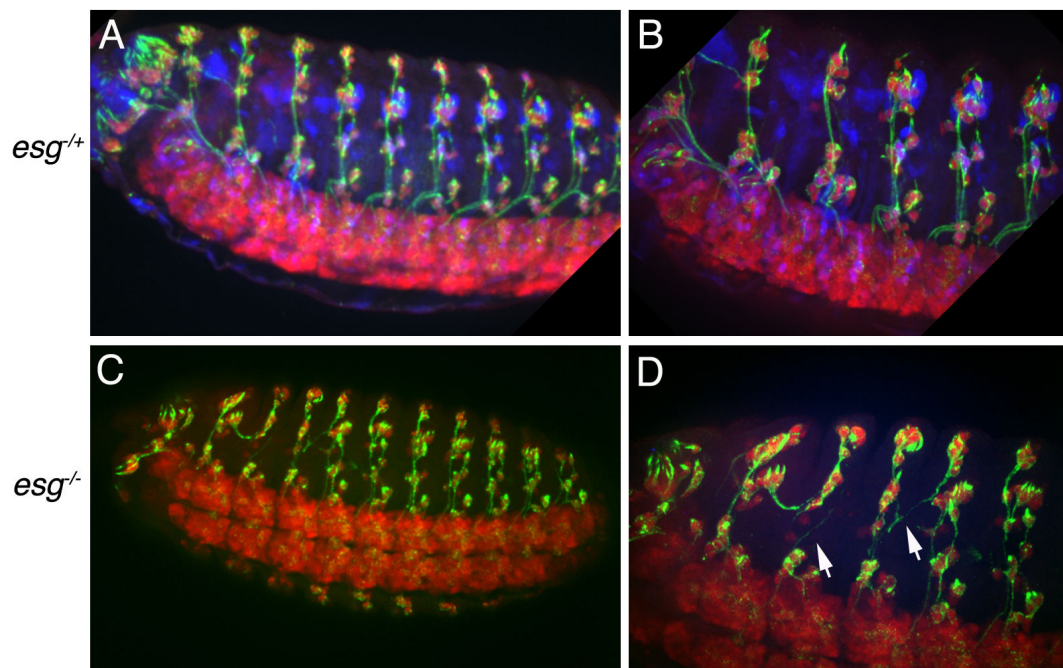
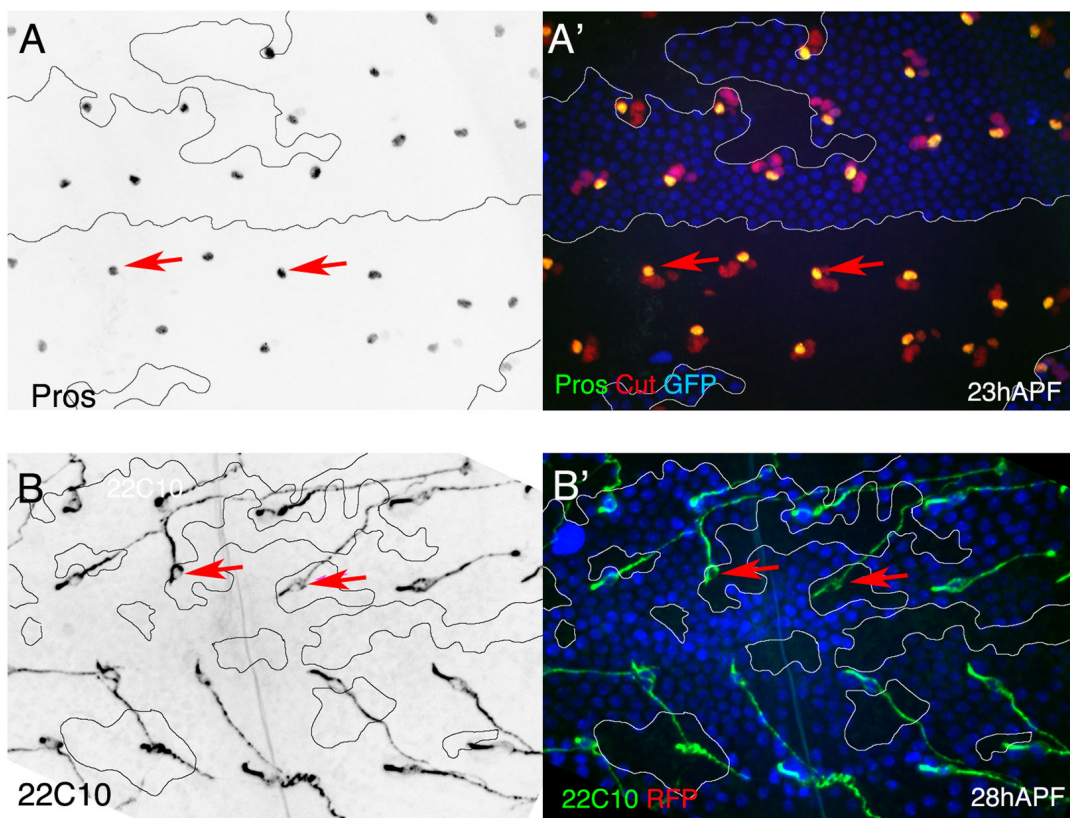
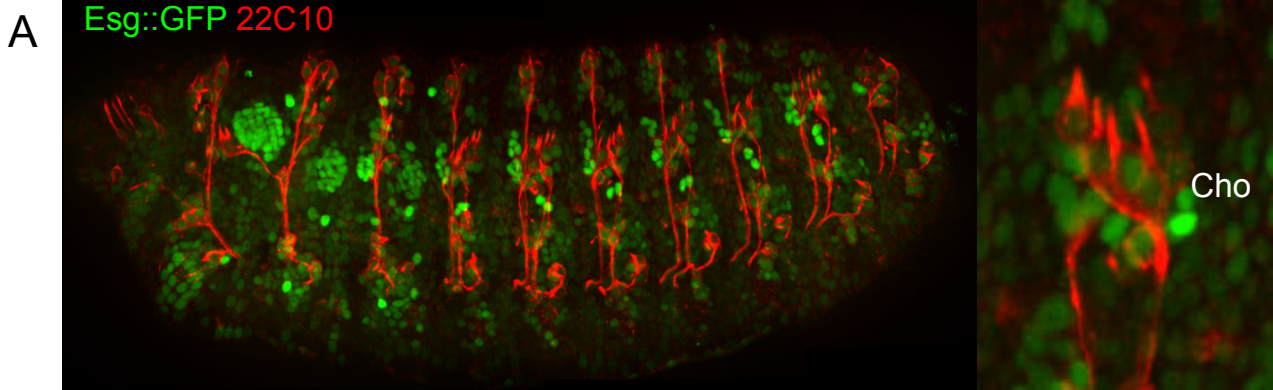




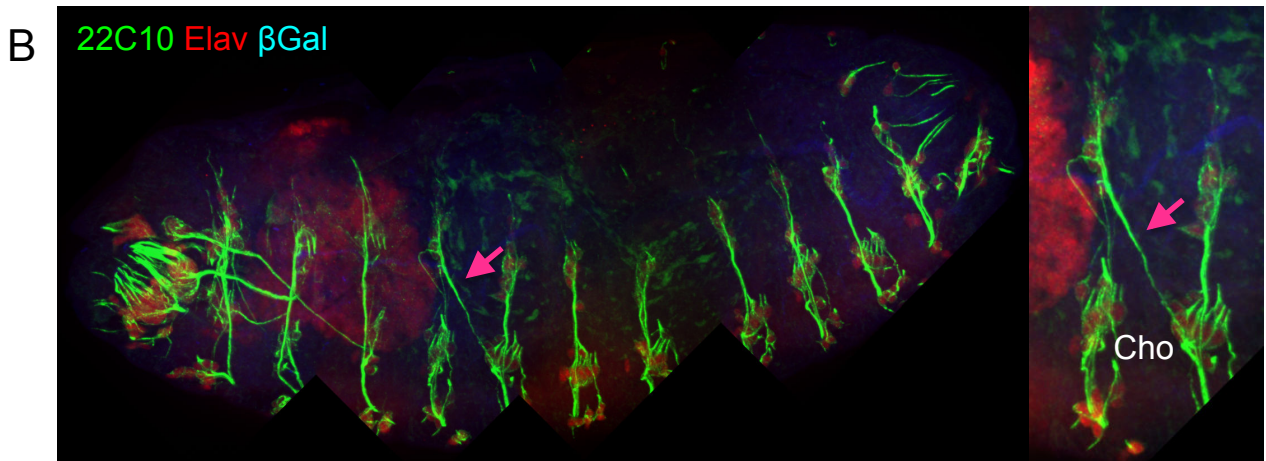
Figure S5



Embryon *esg::GFP* stade 14-16



Embryon *esg<sup>-/-</sup> scrt<sup>-/-</sup>* stade 14-16



**Figure 33 : Esg et Scrt ne participe pas de manière redondante à la formation du système nerveux périphérique de l'embryon**

(A) Expression d'*esg* (vert, identifié grâce à la protéine de fusion Esg::GFP) dans un embryon de stade 14-16. Noter que ce gène est exprimé dans de nombreux organes. Dans le système nerveux périphérique, identifié grâce aux axones (rouge), Esg est présent dans de nombreux organes sensoriels notamment les organes chordotonaux (agrandissement). (B) Embryon double mutant *esg* et *scrt* de stade 14-16. La trajectoire des axones (vert) est altérée (flèche). Les neurones des organes chordotonaux (identifiés par Elav et leur position) ne sont pas affectés dans ces conditions (agrandissement). CHO, organes chordotonaux.

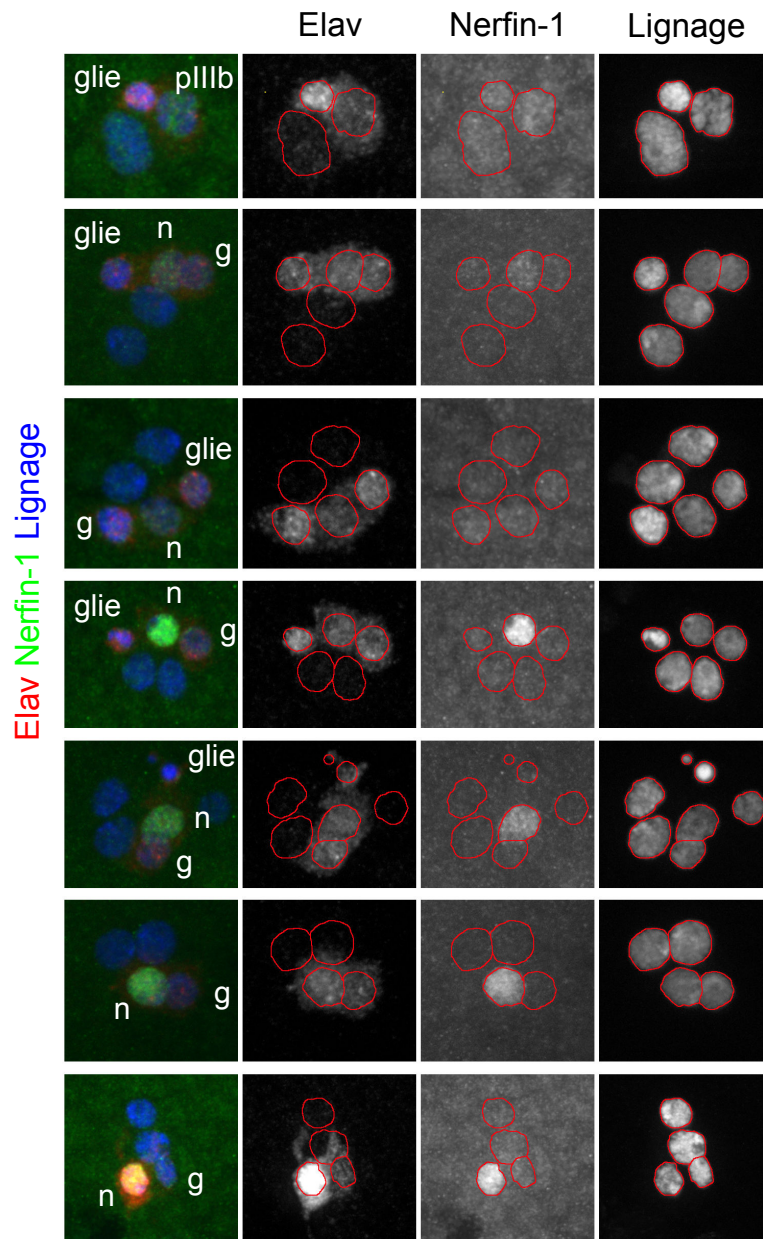
## 2. Escargot et Scratch lors de la formation des organes sensoriels de l'embryon de drosophile

Comme nous venons de le voir, dans les organes sensoriels du système nerveux périphérique de l'embryon, Esg est impliqué dans le contrôle de l'arborisation axonale. Mais quel est le profil d'expression d'*esg* dans les organes sensoriels de l'embryon ? En utilisant la lignée protein-trap *esg::GFP*, j'ai déterminé le profil d'expression d'*esg* dans des embryons de stade 14 à 16. Cette analyse montre que dans l'embryon *esg* est exprimé dans de nombreux tissus : cerveau, tube digestif, cellules épithéliales et système nerveux central. De manière intéressante, grâce à un marquage des axones, j'ai également pu déterminer qu'Esg est exprimé dans tous les neurones du système nerveux périphérique (Fig.33A) et plus particulièrement dans les organes chordotonaux (Fig.33A, grossissement). Or Scrt est exprimé dans les organes chordotonaux de l'embryon où il intervient dans la détermination neuronale (Roark et al., 1995). Ainsi les profils d'expression d'*esg* et *scrt* coïncident dans ces organes. Est-il possible que, comme cela a été observé dans les organes mécanosensoriels, Esg et Scrt régulent de manière redondant l'acquisition de l'identité neurale dans les organes chordotonaux ?

Pour répondre à cette question, j'ai analysé si la formation des organes chordotonaux est perturbée dans les embryons mutants *scrt* et *esg*. Dans ce contexte, les embryons présentent les mêmes défauts d'arborisation axonale que ceux observés dans les embryons mutants *esg*, notamment des projections anormales traversant d'un segment à l'autre (Fig.33B, flèche). Cependant la fréquence d'observation de ces axones mal orientés est comparable à celle obtenue avec des embryons mutants *esg* (10% pour le double mutant *esg/scrt* (n=30) versus 14% pour le mutant *esg* (n=83)). De même je n'ai pas détecté de modifications majeures dans le nombre et la position des neurones (révélés par le marquage Elav) des organes chordotonaux double mutants (Fig.33B, grossissement). Ceci suggère que, bien qu'*esg* et *scrt* soient tout deux exprimés dans les organes chordotonaux de l'embryon, la double perte de fonction *esg* et *scrt* n'affecte pas la formation de ces organes. De plus, dans ce contexte il n'y a pas d'aggravation des défauts d'arborisation axonales par rapport aux embryons mutants *esg*.

En conclusion, ces observations suggèrent qu'Esg et Scrt n'agissent pas de manière redondante lors de la formation des organes chordotonaux de l'embryon.





**Figure 34 : Expression de *nerfin-1* dans le lignage des soies**

Expression de *nerfin-1*, identifiée par un marquage avec un anticorps spécifique, dans le lignage des organes mécanosensoriels. Noter que Nerfin-1 (vert et panel du milieu dans les niveaux de gris) est un marqueur neuronal plus précoce que Elav (rouge et panel de gauche dans les niveaux de gris), la balance d'expression de ce dernier entre le neurone et la gaine n'étant pas encore résolue au début de la détection de Nerfin-1. Les cellules du lignage sont identifiées par Cut (bleu et panel de droite dans les niveaux de gris). glie, cellule gliale ; n, neurone ; g, cellule gaine ; pIIIb, précurseur tertiaire pIIIb.

### 3. Analyse du réseau impliqué dans la détermination neuronale

Comme décrit précédemment, la perte de fonction *esg* dans le notum provoque des défauts d'arborisation axonale, associé avec un retard dans l'établissement de l'expression d'Elav et Pros dans le neurone et la gaine.

L'implication d'Esg dans la détermination neuronale a été observé dans de nombreux modèles, notamment lors de la formation des neurones sensibles au CO<sub>2</sub> (Hartl et al., 2011, voir introduction chapitre IV.2.3.c). Les organes chemosensoriels sensibles au CO<sub>2</sub> sont composés de quatre neurones, une cellule gaine et quatre cellules externes. Comme pour les organes mécanosensoriels, ces 9 cellules sont toutes formées à partir d'un précurseur unique pI. Dans cette étude, les auteurs ont centré leur analyse sur les cellules formées à partir du précurseur pNa, autrement dit deux neurones et la cellule gaine. Dans le sous-lignage pNa, la cellule gaine exprime Prospero alors que les deux neurones expriment Elav, Esg et Nerfin-1. Dans ces organes, la perte de fonction *pros* ou *miR-279* provoque la formation de neurones ectopiques exprimant Esg et Nerfin-1. De même la surexpression simultanée d'Esg et de Nerfin-1 induit la formation de neurones ectopiques. Les auteurs proposent qu'en contexte de perte de fonction *pros* ou *miR-279* ou lors de la surexpression d'Esg et Nerfin-1, la cellule gaine est transformée en neurone. Ainsi Esg et Nerfin-1 collaboreraient pour promouvoir l'acquisition de l'identité neuronale. A l'inverse, Pros et *miR-279* serviraient à la répression de l'expression d'*esg* et de *nerfin-1* et par conséquent à l'inhibition de l'identité neuronale dans la cellule gaine. En accord avec ce modèle, la diminution de dose d'*esg* ou de *nerfin-1* dans des organes mutants *pros* ou *miR-279* diminue significativement le nombre de neurones ectopiques.

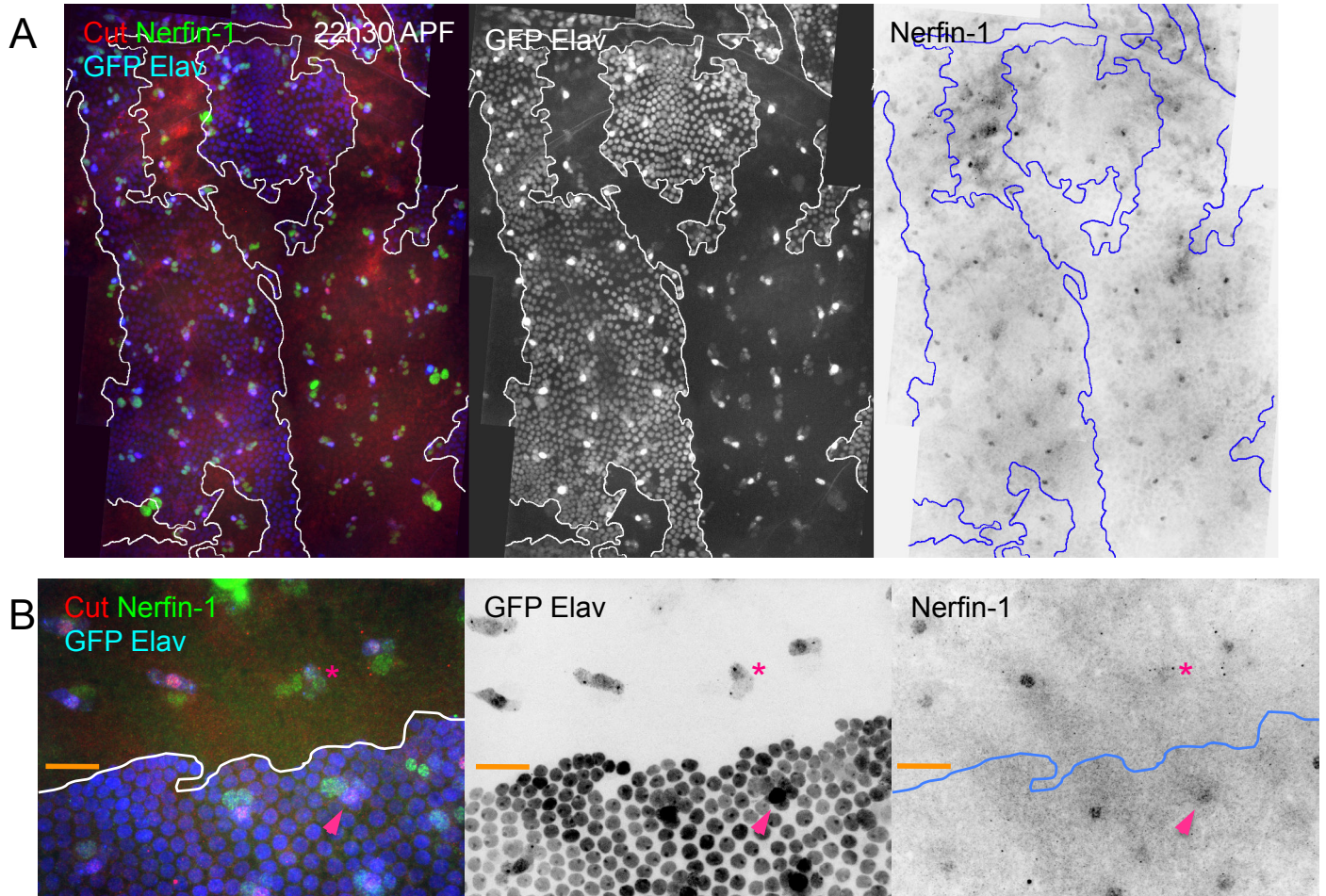
Le réseau de gènes contrôlant la détermination du neurone et de la gaine dans les organes mécanosensoriels est-il similaire à celui observé dans les organes sensibles au CO<sub>2</sub> ?

#### (1) Etude de Nerfin-1 dans les organes mécanosensoriels

Nerfin-1 est un facteur de transcription activant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation neuronale tels que Robo et Futsch (22C10). Sa perte de fonction provoque une altération de l'arborisation axonale dans le système nerveux central de l'embryon de drosophile (Kuzin et al., 2005).

Dans le lignage des soies mécanosensorielles, j'ai analysé l'expression de *nerfin-1*, par marquage avec un anticorps spécifique (Fig.34). Dès la cellule pIIb, une faible





**Figure 35 : La perte de fonction d'*esg* retarde la dynamique d'expression de *nerfin-1* dans le neurone**

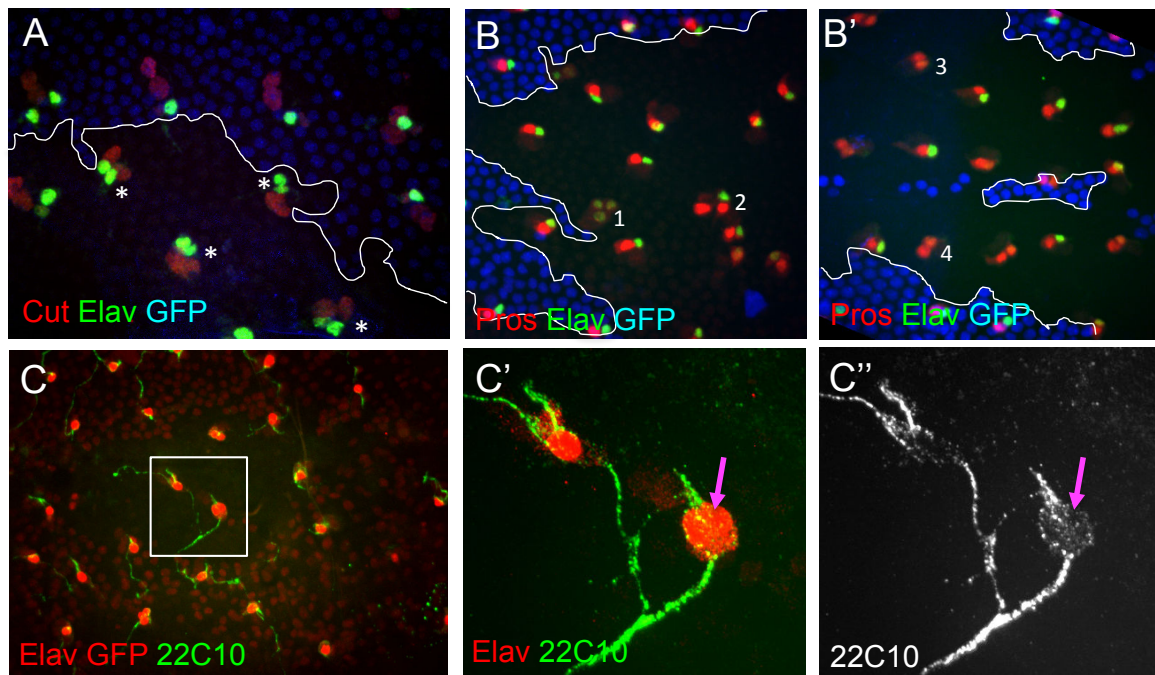
Expression de *nerfin-1* dans des clones mutants *esg*. (A) Notum entier montrant Nerfin-1 (vert et en niveaux de gris à droite) et Elav (bleu et en niveaux de gris à gauche). Noter que, de manière générale, dans les organes mutants *esg* (marqués par l'absence de GFP en bleu) l'expression de *nerfin-1* est similaire à celle des organes contrôles. (B) Agrandissement de la région dorso-centrale. Nerfin-1 (vert et en niveaux de gris à droite) et Elav (bleu et en niveaux de gris à gauche). Noter que dans l'organe mutant où la balance d'expression d'Elav n'est pas résolue (astérisque), l'expression de *nerfin-1* est plus faible comparée à celle de l'organe contrôle controlatéral (tête de flèche). Les cellules du lignage sont identifiées par Cut (rouge). La ligne médiale séparant les organes ipsi- et contro-latéraux est représentée par un trait orange.

expression de Nerfin-1 est détectée. Peu après la division de pIIIb, Nerfin-1 commence à s'accumuler dans le neurone alors qu'Elav est toujours présent dans la cellule gaine. Le niveau d'expression de Nerfin-1 augmente jusqu'à ce qu'Elav soit exclusivement neuronal (soit 24h APF). L'expression de Nerfin-1 diminue ensuite peu à peu jusqu'à disparaître après 28hAPF.

La détermination neuronale, révélée par la dynamique d'expression d'*elav* et *pros*, est retardée en contexte mutant *esg*. Nerfin-1 étant également présent dans cette cellule, j'ai analysé si son expression est modifiée dans ce contexte. De manière générale, la perte de fonction *esg* ne modifie pas drastiquement l'expression de *nerfin-1* (Fig.35A). Je n'ai pas observé une diminution ou une augmentation du niveau général de Nerfin-1 dans le neurone ni une expression ectopique dans la cellule gaine. Mais en portant plus attention au profil d'accumulation de Nerfin-1 dans les organes présentant un retard de détermination neuronale (révélé par un délai de l'expression neuronale d'Elav), l'accumulation de Nerfin-1 est plus faible (Fig.35B, astérisque) comparée à celle observée dans le neurone contrôle contro-latéral indiqué par une flèche (Fig.35B). Ces données montrent que la dynamique d'expression de *nerfin-1*, tout comme celle de *pros* et *elav*, est contrôlée par Esg. De plus, cette observation confirme qu'Esg régule la progression de la détermination neuronale en influençant l'expression de différents facteurs.

J'ai ensuite analysé si comme dans les neurones sensibles au CO<sub>2</sub> Nerfin-1 agit en synergie avec Esg pour contrôler la détermination et la différenciation neuronale. Pour ce faire j'ai réalisée une perte de fonction *esg* en contexte de diminution de dose de *nerfin-1*. Dans ce contexte, il n'y a pas d'aggravation significative de la diminution de la longueur des axones comparée à celle observée lors de la perte de fonction *esg* seul. Ceci suggère qu'Esg et Nerfin-1 ne collaborent pas pour la mise en place de la croissance axonale.

Pour résumer, dans les organes mécanosensoriels Nerfin-1 est présent au début de la vie du neurone. Comme *elav* et *pros*, sa dynamique d'expression est altérée en contexte de perte de fonction *esg*. Toutefois, contrairement au lignage des organes sensibles au CO<sub>2</sub>, mes données suggèrent que ce facteur n'agirait pas en synergie avec Esg pour promouvoir la détermination et la différenciation neuronale. Cependant je ne peux pas exclure que Nerfin-1 soit impliqué dans la détermination et la différenciation



**Figure 36 : La perte de fonction *miR-279* induit la production de neurones ectopiques**

(A-C') Analyse clonale de la perte de fonction *miR-279* montrant la composition des organes (A), la composition du sous-lignage interne (B-B') et la différenciation neuronale (C-C''). Les organes mutants *miR-279* sont identifiés par l'absence de GFP (bleu en A-B' et rouge en C-C''), les cellules du lignage par la présence de Cut (rouge en A), les neurones par Elav (vert en A-B') et les cellules gaines par Pros (rouge en B-B'). La différenciation neuronale est examinée en analysant la croissance des axones, marquées par 22C10 (vert en C-C''). Noter que les organes mutants présentent une augmentation du nombre de cellule Elav positives. Ces neurones ectopiques développent des axones (C) qui fusionnent au niveau du soma (C'-C'', flèche).

neuronale. Une analyse de l'expression de marqueurs neuronaux et de la croissance axonale en contexte mutant *nerfin-1* (par clone mitotique ou RNAi) serait nécessaire pour tester cette possibilité.

## (2) *Etude de miR-279 dans le lignage des soies mécanosensorielles*

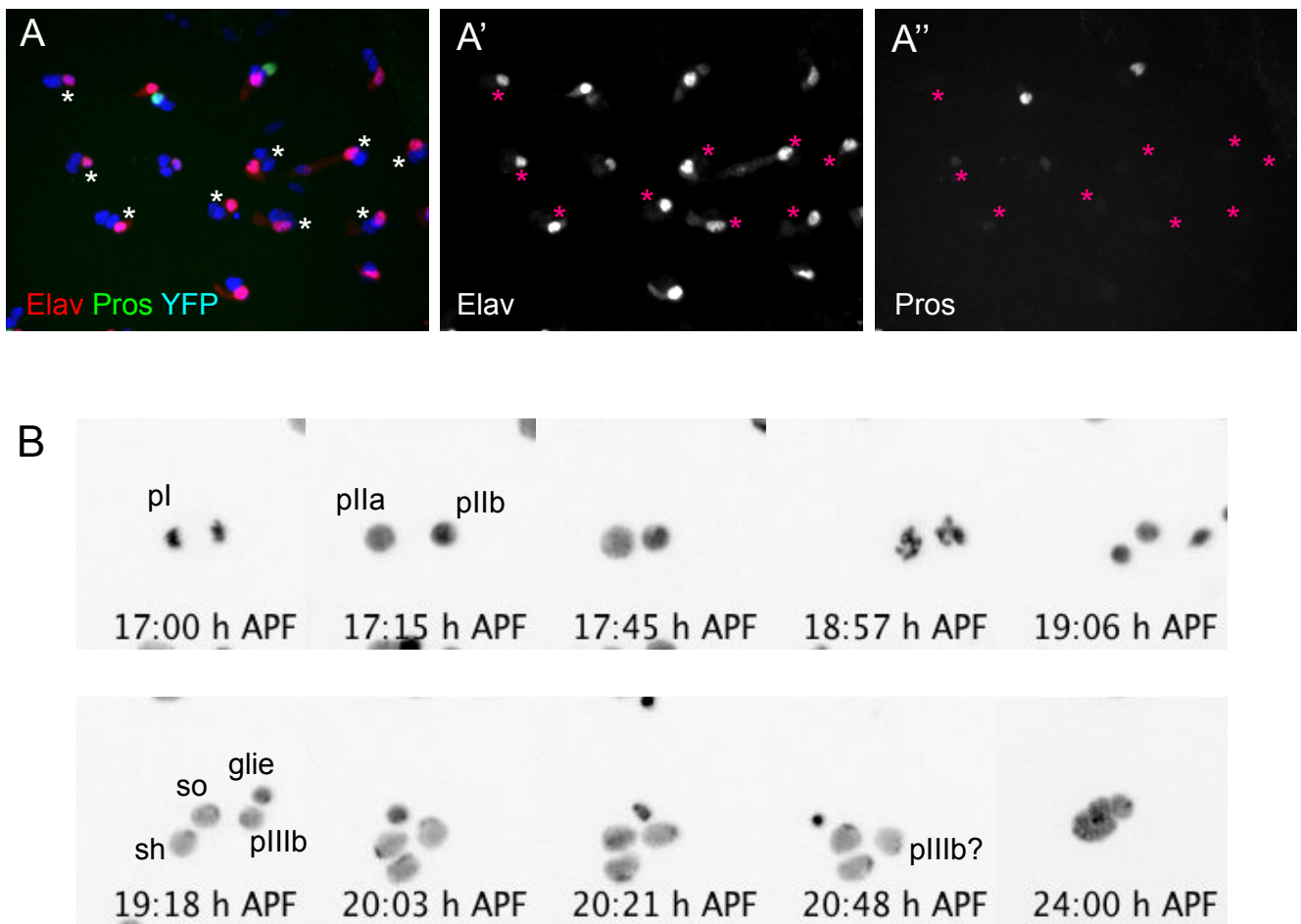
Les miRNA sont des petits ARN endogènes avec une structure secondaire en tige-boucle. Ils sont impliqués dans la répression post-transcriptionnelle de l'expression de gènes cibles par dégradation de leurs ARNm. Dans le lignage des organes sensibles au CO<sub>2</sub>, miR-279 réprime l'expression d'*esg* et *nerfin-1* dans la cellule gaine, empêchant ainsi sa transformation en neurone (Hartl et al., 2011). Bien que dans le lignage des soies mécanosensorielles *Esg* soit présent dans la gaine, j'ai voulu déterminer si miR-279 pouvait être impliqué lors de la formation du sous-lignage neural.

L'analyse clonale de la perte de fonction miR-279 montre un biais vers l'identité neuronale des cellules du sous-lignage pIIb (36% (n=120) des organes mutants). Les cellules générées par pIIa ne semblent pas être affectée par cette perte de fonction (Fig.36A, astérisques). Par ailleurs, dans le sous-lignage pIIb des organes mutants miR-279, le nombre de neurones et de cellules gaines (respectivement déterminés par *Elav* et *Pros* à 26h APF) varie fortement : trois cellules exprimant *Elav* et *Pros* à des niveaux similaires (4,6% des cas, Fig.36B indice 1), un neurone ectopique en plus du neurone et la gaine (9,4%, Fig.36B indice 2), la cellule gaine présente une expression résiduelle d'*Elav* (37%, Fig.36B' indice 3) et finalement des organes avec deux neurones et pas de cellules gaine (49%, Fig.36A astérisques et Fig.36B' indice 4).

Il est à noter que je n'observe jamais plus d'un neurone ectopique dans les organes mutants, favorisant l'hypothèse que cette cellule proviendrait de la transformation de la cellule gliale en neurone plutôt que d'une division ectopique. Bien que la composition du sous-lignage interne soit variable, mes observations montrent clairement que la perte de fonction de miR-279 introduit un biais vers l'identité neuronale. D'ailleurs, en accord avec ces résultats, *Nerfin-1* est exprimé dans 2 à 3 cellules au lieu d'une seule (données non montrées).

Ainsi la perte de fonction de miR-279 semble promouvoir l'acquisition de l'identité neuronale. En analysant la différenciation de ces neurones, j'ai noté un phénomène surprenant. Dans les organes composés de deux neurones, il semble qu'un seul axone se développe (Fig.36C). Cependant à plus fort grossissement il apparaît que les deux neurones développent un axone mais ceux-ci fusionnent ou sont très proches au point





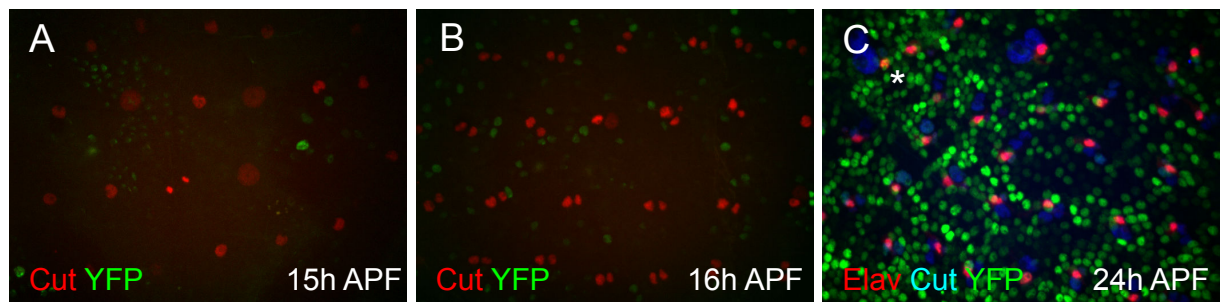
**Figure 37 : La surexpression de *miR-279* transforme le précurseur pIIIb en neurone**

(A-A'') Analyse sur tissu fixé du lignage des soies en contexte de surexpression de *miR-279*. La surexpression de *miR-279* a été réalisée spécifiquement dans le lignage avec *neuralized<sup>p72</sup>>Gal4*. Les cellules du lignage sont identifiées grâce à *UAS>His2B::YFP* (bleu), le neurone par *Elav* (vert et en niveaux de gris en A') et la cellule gaine par *Pros* (rouge et en niveau de gris en A''). Noter que 26h APF, les organes sont composés uniquement de 3 cellules dont une exprime *Elav* et aucune exprime *Pros*. (B) Analyse en temps réel du lignage des soies en contexte de surexpression de *miR-279*. La surexpression de *miR-279* a été réalisée spécifiquement dans le lignage avec *neuralized<sup>p72</sup>>Gal4*. Les cellules du lignage sont identifiées grâce à *UAS>His2B::YFP* (en niveaux de gris). Les heures APF sont indiquées en bas de l'image. Noter que la cellule pIIIb ne se divise pas même après 24hAPF. so, cellule socle ; sh, cellule soie ; glie, cellule gliale.

qu'on ne peut en discerner qu'un seul (Fig.36C'-C'', flèche). Bien que cette curiosité soulève de nombreuses questions, notamment sur la fonctionnalité de ces neurones et sur la division de leur cellule mère, elle montre que le changement d'identité provoqué par la perte de fonction *miR-279* produit un neurone ectopique qui se différencie. Ensemble, ces observations indiquent que, comme dans les organes sensibles au CO<sub>2</sub>, *miR-279* est impliqué dans la répression de l'identité neuronale dans le lignage des soies mécanosensorielles.

Dans cette hypothèse, la surexpression de *miR-279* devrait réprimer l'identité neuronale et conduire à une disparition du neurone par une transformation de cette cellule en gaine. Or dans ce contexte, le sous-lignage interne n'est composé que d'une cellule : un neurone (Fig.37A-A''). L'absence de *miR-279* conduit-elle à la mort de la cellule gaine ? Comment le neurone est-il formé ? Pour répondre à ces questions, une analyse en temps réel a permis de suivre la formation du lignage obtenu par surexpression de *miR-279* (Fig.37B). Dans ce contexte, jusqu'à la formation du précurseur tertiaire pIIIb, la cadence des divisions ainsi que les différentes identités ne sont pas affectées. Cependant, la cellule pIIIb ne se divise pas. La seule cellule interne détectée dans ce contexte étant un neurone, la cellule pIIIb qui ne se divise pas doit acquérir l'identité neuronale. Ainsi la surexpression de *miR-279* semble promouvoir l'acquisition de l'identité neuronale, provoquant transformation du précurseur pIIIb en neurone.

En résumé, les analyses par perte et gain de fonction *miR-279* donnent des résultats contradictoires. D'un côté *miR-279* serait un répresseur de l'identité neuronale alors que de l'autre il promouvrait cette identité. Cependant, forcer l'expression de *miR-279* dans toutes les cellules du lignage pourrait conduire à exprimer un mirRNA dans une cellule où il n'est peut-être pas présent normalement et ainsi affecter l'expression de nombreux gènes. Notamment ces gènes pourraient être requis pour maintenir le caractère précurseur de la cellule pIIIb. Cette cellule ne serait plus capable de se diviser et l'identité neuronale serait mise en place. Ainsi sa transformation en neurone pourrait être due à une perte de la capacité proliférative de pIIIb plutôt qu'à un effet direct de *miR-279* sur l'identité neuronale. Pour analyser cette hypothèse, j'ai réalisé une analyse du profil d'expression de *miR-279* dans le lignage des soies. Pour ce faire j'ai utilisé la



**Figure 38 : La lignée *miR-279>Gal4* n'est pas exprimée dans le lignage des soies**

Expression de *miR-279>gal4* révélée grâce à UAS>His2B::YFP (vert) dans le notum à 15hAPF (A), 16hAPF (B) et 24hAPF (C). Les cellules du lignage des soies sont identifiées par Cut (rouge en A et B, bleu en C), le neurone par Elav (rouge en C). Noter que *miR-279>gal4* est exprimé dans les cellules épithéliales mais pas dans les cellules du lignage des soies sauf quelques rares exceptions (astérisque en C).

lignée comportant la construction *miR-279>Gal4*, utilisée lors des expériences dans les neurones sensibles au CO<sub>2</sub>, en combinaison avec un rapporteur GFP. De manière surprenante, la GFP est détectée tardivement et majoritairement en motif « poivre et sel » dans les cellules épithéliales entourant les organes sensoriels (Fig.38A-C). A part quelques rares exceptions (Fig.38C, astérisque) qui ne sont pas corrélées avec une identité spécifique, je n'ai pas détecté de GFP dans les cellules du lignage des soies. Sachant que l'analyse fonctionnelle de miR-279 montre qu'il est impliqué dans la détermination neuronale, ce profil d'expression implique que son effet soit non autonome cellulaire, autrement dit que les cellules épithéliales autour de l'organe participent à la détermination neuronale. Pour analyser cette hypothèse, je propose de réaliser une perte de fonction *miR-279* spécifiquement dans les cellules du lignage en surexprimant une séquence nucléotidique permettant de titrer le miRNA (appelée sponge). Alternativement, il est possible que le promoteur utilisé pour l'expression de Gal4 ne récapitule pas le profil d'expression de miR-279 dans le lignage. Une hybridation *in situ* en fluorescence des ARN (RNA FISH) serait nécessaire pour confirmer ou non l'absence de miR-279 dans les cellules du lignage.

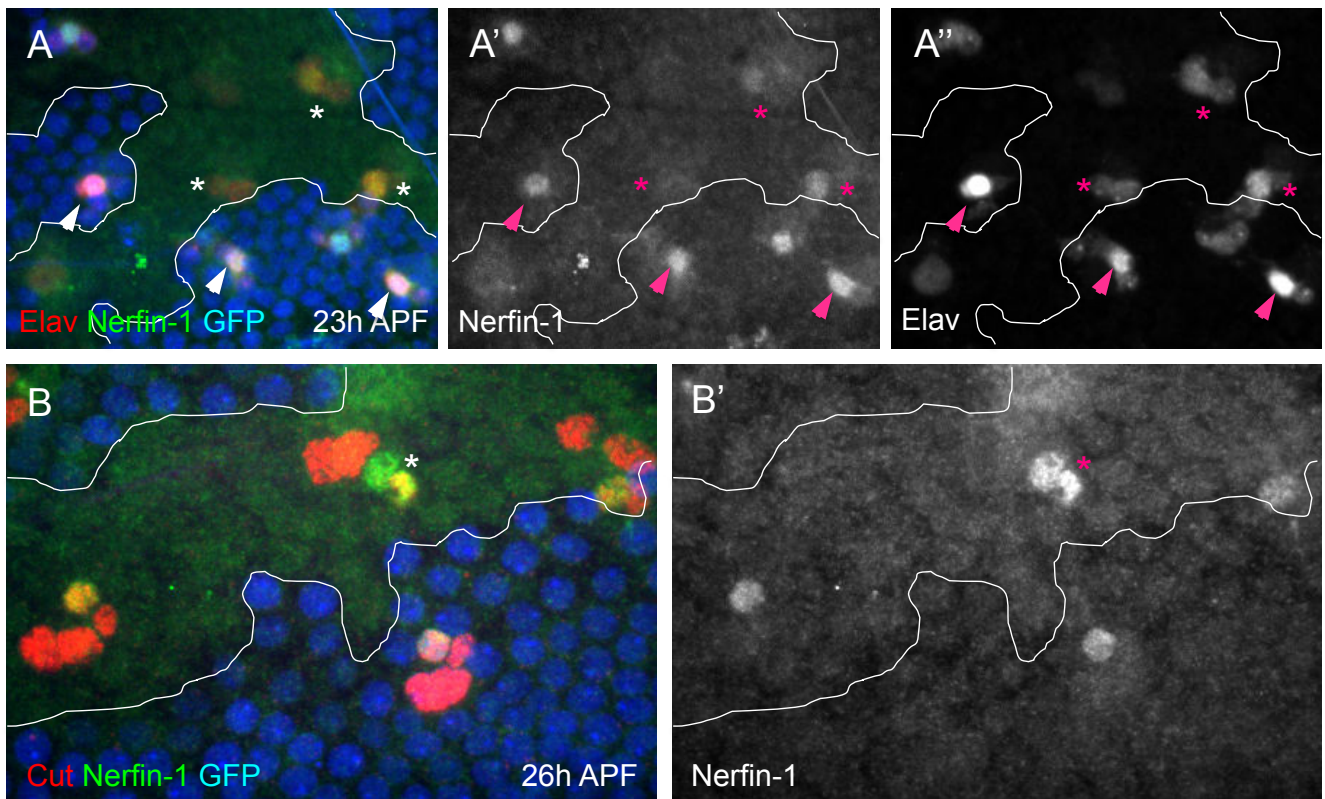
Pour conclure, mon analyse fonctionnelle de miR-279 montre des résultats contradictoires concernant son implication lors de la détermination neuronale. Des données supplémentaires (profil d'expression, perte de fonction spécifiquement dans le lignage) seront nécessaires pour conclure sur ces résultats et comprendre l'implication de miR-279 dans le sous-lignage pIIb.

### (3) *Le pic initial de Pros est nécessaire à la détermination neuronale dans le lignage des soies mécanosensorielles*

Mes résultats montrent que le pic de Pros au début de la vie du neurone est nécessaire pour la détermination neuronale dans les organes mécanosensoriels. En effet sa perte de fonction conduit dans 40% des organes à un défaut de différenciation neuronale corrélée à une absence d'accumulation d'Elav dans le neurone et à une perdurance de son expression dans la gaine.

Peu de temps après la formation du neurone (autrement dit à un moment où Pros est présent), Nerfin-1 commence à s'accumuler dans le neurone (voir Fig.34). Dans un contexte de perte de fonction *pros*, l'expression de *nerfin-1* est plus faible (Fig.40A-A'', astérisques) comparée à celle dans les neurones adjacents non mutants (Fig.40A-A'', flèches). A des stades plus tardifs, j'observe que, dans les organes mutants *pros*, Nerfin-1





**Figure 39: La perte de fonction de *prospero* provoque une altération de l'expression de *nerfin-1***

Expression de *nerfin-1* dans des organes mutants *pros* à 23h APF (A-A'') et 26h APF (B-B'). *Nerfin-1* est révélée grâce à un anticorps spécifique (vert et en niveaux de gris en A' et B'). Le neurone est identifié par *Elav* (rouge en A et en niveaux de gris en A'') et les cellules du lignage des soies par *Cut* (rouge en B). Les cellules mutantes sont marquées par une absence de GFP (bleu). Noter que à 23h APF, l'expression de *nerfin-1* est plus faible dans les organes mutant *pros* (astérisques) que dans les organes contrôles (têtes de flèche). Par contre à 26h APF, *nerfin-1* est détecté dans deux cellules de 15% organes mutants *pros* (astérisque, n=15) au lieu d'une seule dans les contrôles.

est présent dans le neurone mais également de manière ectopique dans la gaine (Fig.40B-B', astérisques). Ces résultats suggèrent que la présence de Pros au début de la vie du neurone permettrait l'établissement de l'expression de Nerfin-1, Elav et probablement d'autres facteurs requis pour la différenciation neuronale. De même, son expression tardive dans la gaine réprimerait Elav et Nerfin-1 pour permettre la mise en place de l'identité gaine.

Dans les organes sensibles au CO<sub>2</sub>, Pros promeut l'identité de la cellule gaine en réprimant l'expression d'*esg*. Cependant une analyse clonale de la perte de fonction *pros* dans les organes mécanosensoriels montre que l'expression d'*esg* est similaire entre les organes mutants et contrôles. Donc, contrairement aux organes sensibles au CO<sub>2</sub>, Pros promeut l'acquisition de l'identité gaine indépendamment d'une répression de l'expression d'*esg*. Le rapport d'épistasie entre *Esg* et *Pros* diffère entre les deux types d'organe sensoriel.

Pros aurait un rôle ambivalent : d'une part il promeut l'identité neuronale et l'expression de facteurs neuronaux, d'autre part il promeut l'identité gaine en réprimant l'expression de ces mêmes facteurs. Donc contrairement au lignage des neurones sensibles au CO<sub>2</sub>, Pros est nécessaire à l'acquisition de l'identité neuronale et à la croissance axonale dans les soies mécanosensorielles. Mais son rôle dans la mise en place de l'identité gaine semble conservé entre les deux systèmes même si cela découlerait d'un mécanisme différent, indépendant de la répression de l'expression d'*esg* par Pros.

Pour conclure cette partie, mes résultats indiquent que la détermination neuronale dans les organes mécanosensoriels repose sur la présence initiale de Pros dans le neurone. Dans des organes mutants *esg*, ce pic d'expression étant diminué, la détermination ainsi que la différenciation neuronales sont retardées. Pour la cellule gaine, nous ne disposons pas de moyens aussi précis que la croissance axonale pour quantifier sa différenciation. Mais il est fort probable que, tout comme le neurone, la mise en place de l'identité gaine soit retardée dans un contexte mutant *esg*.

## **II. Mécanisme d'interaction entre Escargot, Scratch et la voie Notch**

Mes expériences indiquent qu'*Esg* et *Scr* agissent de manière redondante pour maintenir l'identité pIIb en empêchant l'activation ectopique de Notch dans cette cellule.



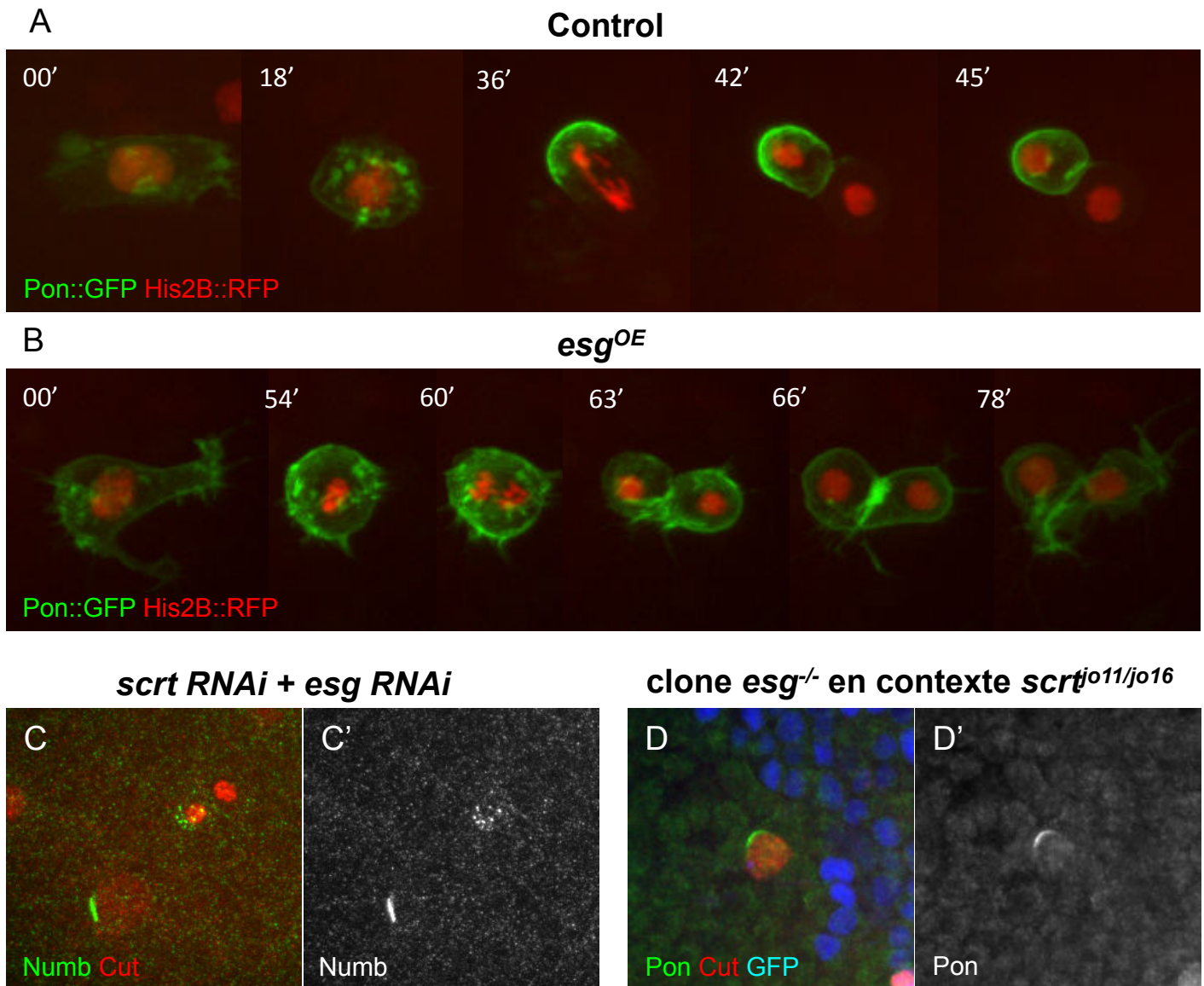
En effet mes données montrent que la perte de fonction *esg/scrt* provoque une transformation d'identité de pIIb en pIIa. Sachant que l'acquisition de l'identité pIIa est dépendante de l'activation de la voie Notch dans cette cellule, mes données supposent que la voie Notch est ectopiquement activée dans la cellule pIIb en contexte de perte de fonction *esg/scrt*. En accord avec cette idée, une diminution de la quantité du récepteur Notch diminue la fréquence des transformations dans ce contexte. Réciproquement, une activation de la voie par une surexpression faible de la partie intracellulaire active de Notch ( $N_{intra}$ ) augmente la fréquence des transformations. Ainsi Esg, Scrt et la voie Notch interagissent. Une interaction avec la voie Notch peut survenir à différents niveaux : lors de l'établissement du signal en régulant notamment le récepteur et les ligand ou lors de la réponse au signal en agissant sur la formation du complexe activateur ou sur l'expression des gènes cibles.

### **1. Escargot et Scratch ne régulent pas l'asymétrie de la division de la cellule pI.**

Dans l'embryon de drosophile, Snail régule l'endocytose du ligand Delta dans les cellules mésodermiques via Neuralized, permettant ainsi l'activation du signal Notch dans cellules mésoectodermiques adjacentes (Morel et al., 2003). De plus, il a également été montré que Snail, Esg et Worniu contrôlent de manière redondante la localisation asymétrique de facteurs lors de la division des neuroblastes embryonnaires dans un processus appelé télophase rescue (Ashraf et al., 2001 ; Cai et al., 2001).

Or dans les organes mécanosensoriels, la répartition asymétrique de facteurs tels que Numb ou Neuralized lors de la division est essentielle à l'activation différentielle de Notch entre les deux cellules filles (Guo & al., 1996 ; Le Borgne et Schweisguth, 2003). En effet ces facteurs vont contrôler le trafic intracellulaire du récepteur et du ligand. Leur répartition asymétrique assure que la voie Notch ne soit activée que dans une seule des cellules filles après la division. J'ai donc analysé si Esg et Scrt, bien que leur expression n'aient pas été détectée en pI, pouvaient modifier la localisation asymétrique de déterminants cellulaires dans cette cellule et ainsi perturber l'activation différentielle de Notch entre ses filles.

Dans un premier temps j'ai étudié la localisation asymétrique de Partner-of-Numb (Pon), une protéine adaptatrice qui favorise la localisation asymétrique de Numb. A chaque division, Pon est asymétriquement localisé (Fig.40A) et il est hérité par la cellule où la voie Notch ne sera pas activée (pIIb, pIIIb, la cellule soie et le neurone). Or dans un



**Figure 40 : La présence ectopique d'Esg en pl perturbe l'asymétrie de la division**

(A-B) Analyse en temps réel de la division asymétrique dans des organes mécanosensoriels contrôles (A) ou surexprimant *esg* (B). La lignée transgénique comportant *neuralized<sup>P72</sup>>gal4* est utilisée pour réaliser la surexpression d'Esg, de His2B::RFP (rouge) et Pon::GFP (vert). Les minutes après le début du film sont indiquées dans le coin supérieur gauche des images. Noter que la ségrégation de Pon::GFP au moment de la division n'est pas asymétrique dans un contexte de surexpression d'*esg*. (C-D') Analyse de la division asymétrique en contexte de double perte de fonction *esg* et *scrt* par RNAi (C-C') et par clone mitotique d'un allèle *esg* nul en contexte hétéroallélique *scrt* (D-D'). Les cellules du lignage sont identifiées par Cut (en rouge) et les clones mutants par l'absence de GFP (bleu). Noter que la localisation de Numb (vert en C et en niveaux de gris en C') et de Pon (vert en D et en niveaux de gris en D') n'est pas affectée par le double perte de fonction *esg* et *scrt*.

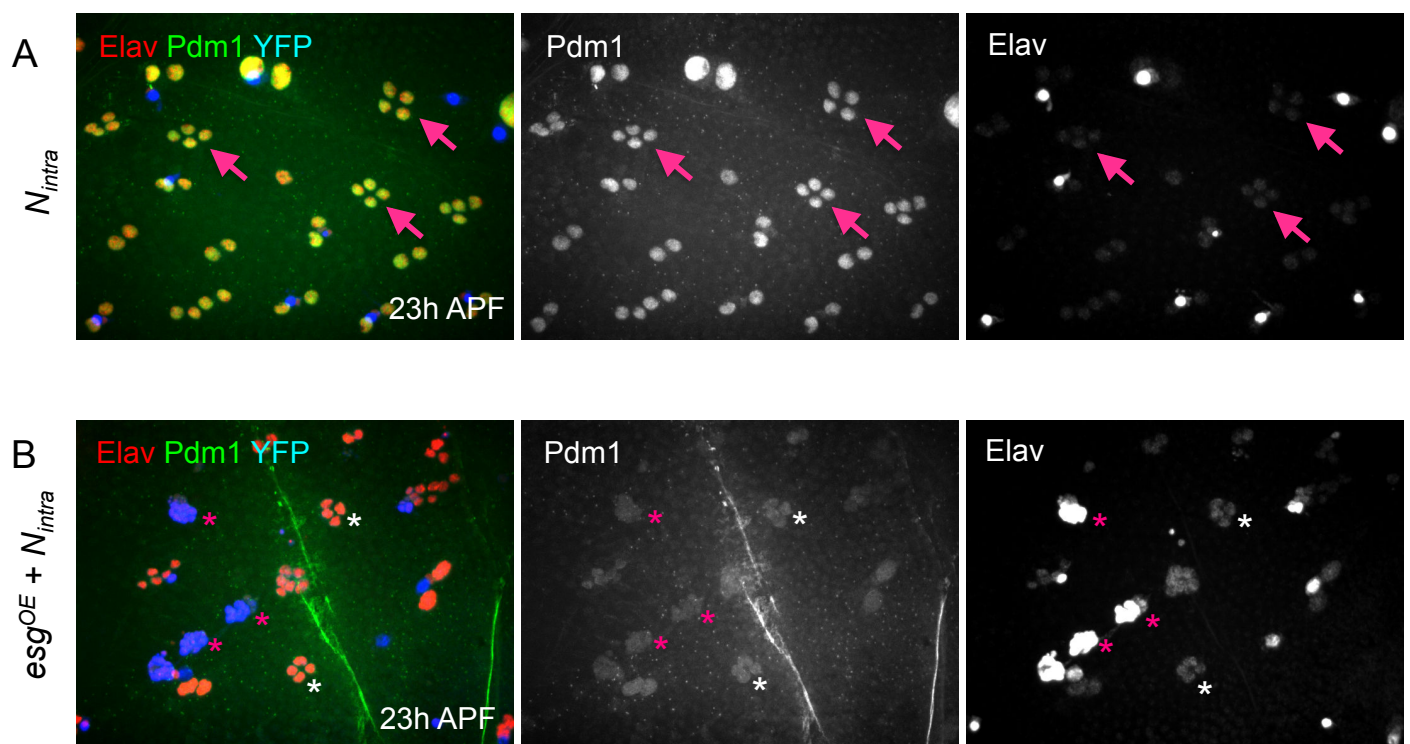
contexte de surexpression d'Esg, un marquage avec un anticorps spécifique montre que la localisation de Pon n'est pas asymétrique (donnée non montrée). Afin de confirmer cette observation, une analyse *in vivo* utilisant la protéine de fusion Pon::GFP montre que dans ce contexte sa répartition au moment de la division est égale entre les deux cellules (Fig.40B). De plus, Pon::GFP reste à l'interface entre les deux cellules après la division. Ainsi la présence d'Esg dans la cellule pI affecte la localisation asymétrique de Pon et probablement d'autres facteurs impliqués dans le trafic intracellulaire du récepteur Notch tel que Numb.

Néanmoins l'analyse de la localisation de Pon ou Numb dans un contexte de perte de fonction *esg* et *scrt* (par RNAi ou par clone mitotique) n'a pas permis de mettre en évidence un problème de répartition asymétrique (Fig.40C-D'). En effet, dans un contexte où *esg* et *scrt* sont inhibé par RNAi, la localisation de Numb au moment de la division de pI est asymétrique et forme comme attendu un croissant antérieur (Fig.40C-C', n=14). De même, Dans les cellules pI mutantes *esg* en contexte hétéroallélique *scrt* ont une localisation normale de Pon au moment de la division (Fig.40D-D', n=19). Toutefois la pénétrance du phénotype de transformation de pIIb en pIIa dans un contexte mutant *esg* et *scrt* étant de 16%, il est possible que pour les organes analysés la transformation n'ait pas lieu. Néanmoins, ces données, associées au fait qu'Esg et Scrt ne sont pas détectables dans la cellule pI, me conduisent à considérer que le défaut de localisation asymétrique observé lors de la surexpression d'Esg est probablement dû à la présence ectopique d'Esg dans pI plutôt qu'à un effet d'Esg et Scrt sur l'asymétrie de la division.

## **2. Escargot contrecarre l'activation de la voie Notch**

Puisque Esg et Scrt ne semblent pas être impliqués dans la ségrégation asymétrique des facteurs contrôlant le trafic du récepteur, j'ai analysé si ces facteurs pouvaient agir en amont de l'activation du récepteur. Dans ce but, j'ai réalisé des tests d'interactions génétiques en surexprimant Esg dans un contexte où l'activation de la voie Notch est forcée suite à une surexpression de  $N_{intra}$ . Dans l'hypothèse où Esg et Scrt agissent sur la réponse à l'activation de la voie, Esg devrait supprimer l'effet induit par la surexpression de  $N_{intra}$ .

La surexpression de  $N_{intra}$  dans les précurseurs secondaires induit une transformation de pIIb vers pIIa et conduit à la formation d'un lignage composé de quatre cellules externes (deux soies et deux socles si la surexpression est transitoire et



**Figure 41 : La surexpression d'Esg contrecarre l'activation de la voie Notch**

Analyse de l'interaction entre Esg et la voie Notch. (A) Organes surexprimant  $N_{intra}$ . Noter la présence d'organes composés uniquement de cellules externes (flèches). (B) Organes surexprimant  $N_{intra}$  et Esg. Noter la présence de deux types d'organes : des organes composés uniquement de cellules internes (astérisques roses) ou bien composés uniquement de cellules externes (astérisques blanches). Les neurones sont identifiés par Elav et les cellules externes par Pdm1. *neuralized<sup>P72</sup>>gal4* est utilisé pour réaliser la surexpression et la construction *UAS>Histone2B::YFP* permet de visualiser l'expression de *neuralized*.



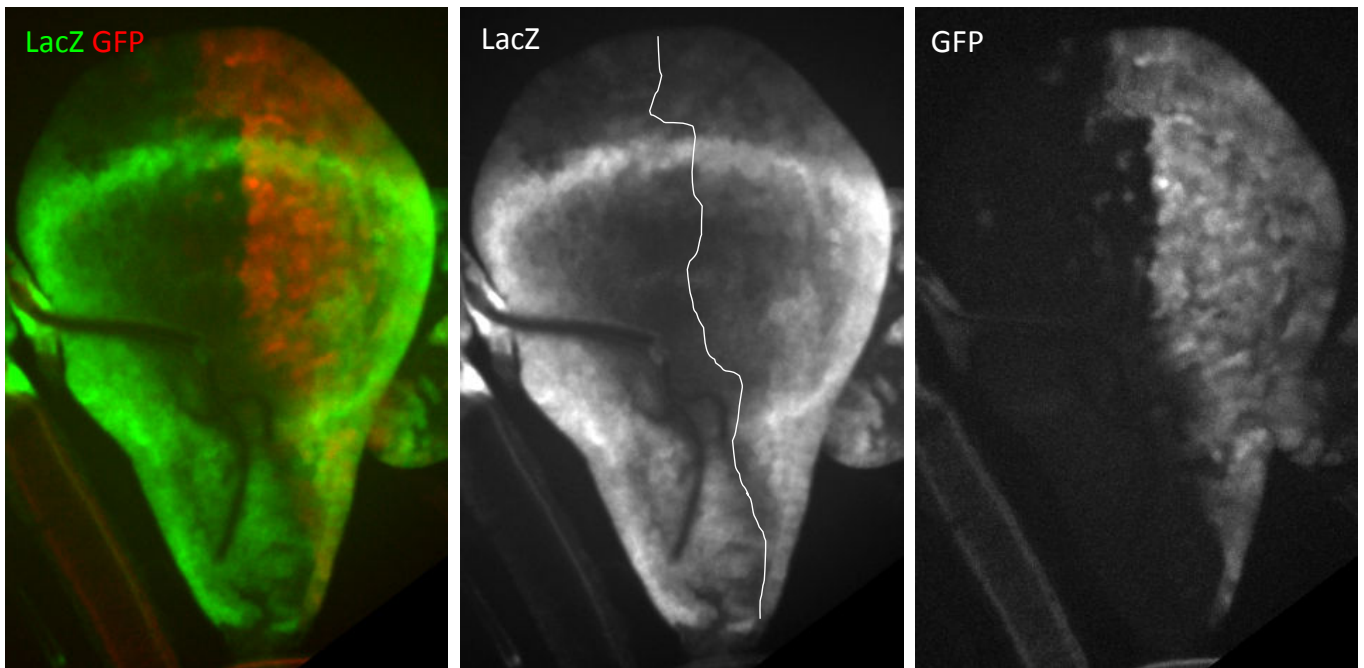
quatre cellules souches si la surexpression est maintenue) exprimant toutes le marqueur Pdm1 (Fig.41A, flèches). Or ce n'est pas le phénotype que j'observe si Esg est surexprimé en même temps. En effet, la surexpression d'Esg et N<sub>intra</sub> au début de la vie de pI (grâce à la construction *neuralized<sup>p72</sup>>Gal4*) provoque la formation d'organes ne comportant que des cellules de type interne (soit neurones et cellules gaines). Or comme nous l'avons vu précédemment la surexpression d'Esg ou Scrt aboutit à la formation de ce type d'organe. Ensemble, ces données montrent que la surexpression d'Esg est épistatique sur la surexpression de N<sub>intra</sub>, suggérant qu'Esg est capable d'empêcher la réponse à l'activation de Notch.

En accord avec cette idée, une surexpression plus tardive (peu avant la division de pI) aboutit à des résultats similaires même si l'effet est moins tranché. En effet dans cette expérience les nota présentent stochastiquement trois types de phénotype :

- exclusivement des organes composés de cellules externes (correspondant à la surexpression de N<sub>intra</sub>)
- exclusivement des organes composés de cellules internes (comme lors de la surexpression d'Esg)
- les deux types d'organes dans un seul et même notum. Autrement dit des organes composés uniquement de neurones (Fig.41B, astérisques roses) alors que leurs voisins sont composés des quatre grosses cellules correspondant à des cellules externes, même si ces cellules n'expriment pas le marqueur Pdm1 (Fig.41B, astérisques blanches). Ces résultats suggèrent qu'Esg et N<sub>intra</sub> sont en compétition pour la mise en place de l'identité neurale et non neurale respectivement. Néanmoins cette compétition provoque des problèmes de résolution de l'identité, notamment pour l'expression de certains marqueurs comme Pdm1.

Mes données montrent qu'Esg peut contrer l'activation de la voie Notch suite à la surexpression de N<sub>intra</sub>, indiquant qu'il agit sur la voie Notch en amont de l'activation du récepteur. Bien que ces expériences n'ont pas été réalisées avec Scrt, la redondance entre Esg et Scrt lors de la mise en place de l'identité pIIb laisse penser que Scrt pourrait avoir le même effet sur la voie Notch. Toutefois ces résultats conduisent à s'interroger sur le mécanisme sous-jacent à cette interaction. Esg agit-il sur la formation du complexe activateur ou sur l'expression des gènes cibles de Notch ?





**Figure 42 : Escargot ne contrecarre pas l'activation de la voie Notch en interagissant directement avec  $N_{intra}$  dans le disque d'aile de drosophile**

Expression d'un rapporteur minimal de l'activité Notch (LacZ en vert et en niveaux de gris au milieu, Furriols et Bray, 2001) en contexte de surexpression d'esg. Esg est surexprimé dans la région postérieure du disque d'aile grâce à *engrailed>gal4* dont l'expression est visualisée grâce à *UAS>GFP* (en rouge et en niveaux de gris à droite). Noter que la surexpression d'Esg ne modifie pas le profil d'expression du rapporteur minimal de l'activité Notch à la frontière dorso-ventrale.

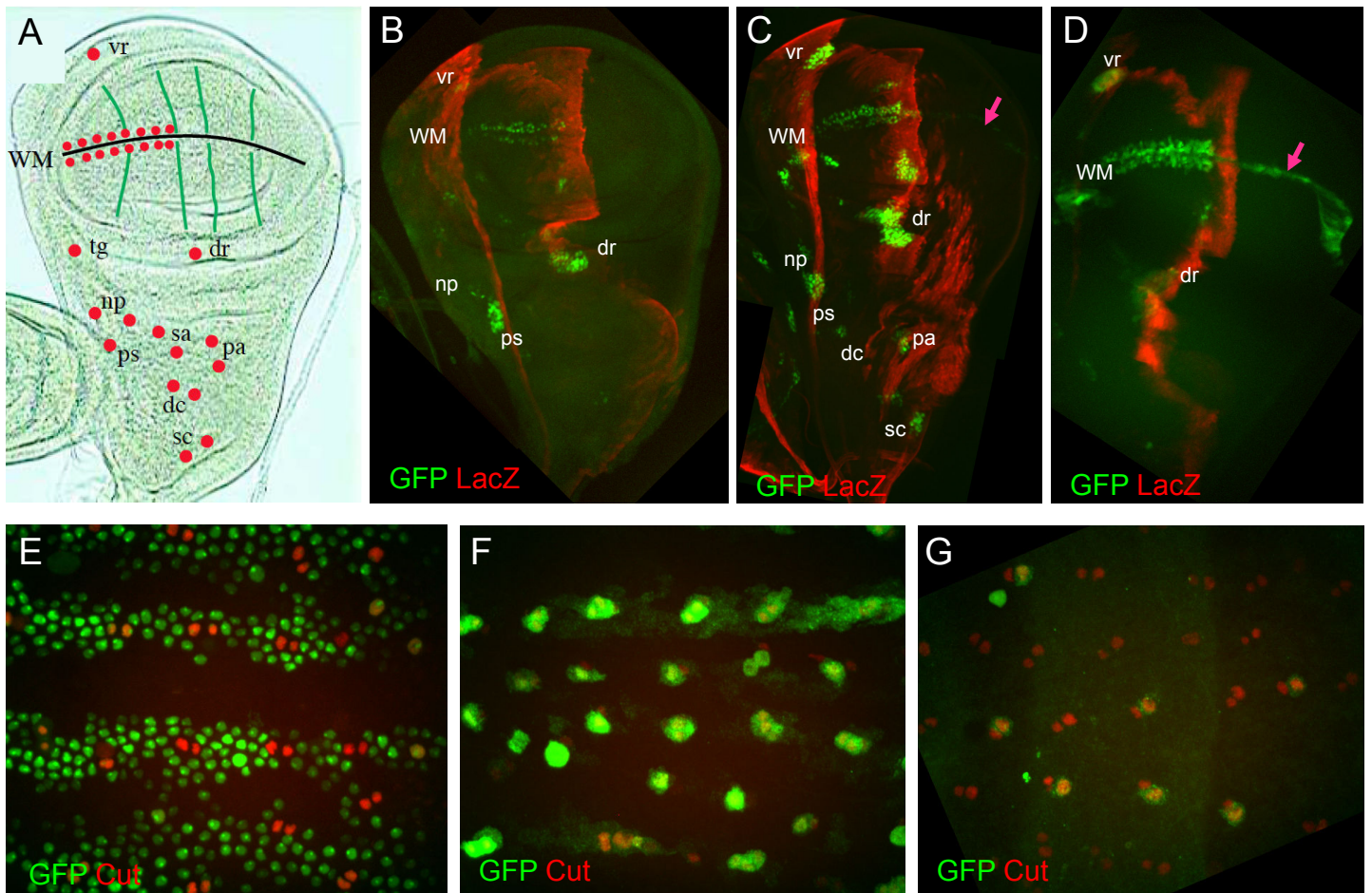
### 3. Escargot n'interagit pas directement avec N<sub>intra</sub> pour moduler la réponse à l'activation de Notch.

Une étude récente a montré dans des cellules d'hépatocarcinome en culture que l'orthologue d'Esg, Sna1, interagit physiquement avec N<sub>intra</sub>. En effet le domaine doigt de zinc de Sna1 interagit directement avec la région ankyrine de N<sub>intra</sub>. Cette interaction implique que Sna1 entre en compétition avec Mastermind pour la liaison avec N<sub>intra</sub>, empêchant ainsi la formation du complexe activateur (Lim et al., 2011 ; Kim et al., 2013).

Pour analyser si un tel mécanisme se produit dans le lignage des soies, j'ai étudié l'expression d'un rapporteur minimal de l'activité Notch suite à la surexpression d'Esg. Ce rapporteur, déjà décrit dans l'introduction (voir introduction, chapitre II.1.3.b), est constitué d'un promoteur composé uniquement de sites de fixation pour Su(H) et Grainyhead en amont de la séquence codant la  $\beta$ -Galactosidase. Ainsi uniquement une interaction avec les facteurs du complexe activateur ou du complexe répresseur peut influencer l'expression de ce rapporteur minimal. Dans le disque d'aile, l'expression du rapporteur est similaire à celle du gène *E(spl)m $\beta$* . Autrement dit la  $\beta$ -Galactosidase est détectée à bas niveau dans quasiment tout le disque d'aile avec toutefois une expression plus marquée au niveau de la frontière dorso-ventrale (Fig.11 ; Furriols et Bray, 2001).

Dans des conditions de surexpression d'Esg dans le compartiment postérieur du disque d'aile (en utilisant *engrailed>Gal4* et détectée grâce à la co-expression de la GFP), l'expression du rapporteur n'est pas modifiée. En effet, le long de la frontière dorso ventrale, l'expression du gène rapporteur est la même entre les cellules du compartiment antérieur et celles du compartiment postérieur où Esg est surexprimé (Fig.42). Or dans l'hypothèse où Esg interagit directement avec N<sub>intra</sub>, empêchant ainsi la formation du complexe activateur, l'expression de ce rapporteur ne devrait plus être détecté dans les cellules où Esg est présent.

En conclusion ces expériences indiquent donc qu'Esg module la réponse à la voie Notch indépendamment d'une interaction directe avec N<sub>intra</sub>. Cependant il est important de noter que ces expériences ont été réalisées dans le disque d'aile et non pas dans les organes mécanosensoriels puisque ce rapporteur minimal de l'activité Notch n'est pas exprimé dans ce tissu (données non montrées). Les cellules composant le disque d'aile et celles des organes mécanosensoriels sont deux types cellulaires totalement différents. Par ailleurs, la réponse à l'activation de la voie Notch est extrêmement dépendante du contexte cellulaire. Ainsi l'absence d'effet d'Esg sur ce rapporteur pourrait provenir de



**Figure 43 : Expression des rapporteurs de *E(spl)m4*, *E(spl)m8*, *E(spl)malpha* et *E(spl)mgamma* dans le disque d'aile et le notum**

(A) Schéma de la localisation des organes sensoriels dans le disque d'aile. Image extraite de de Celis et al., 1996. (B-G) Expression des rapporteurs des gènes *E(spl)m4* (B et E), *E(spl)ma* (C), *E(spl)mβ* (D et F) et *E(spl)mγ* (G) dans le disque d'aile (B-D) et dans le notum (E-G). (B-D) La frontière antéro-postérieure est visible grâce à *dpp>LacZ* (rouge). (E-G) les cellules du lignage sont identifiées par Cut (rouge). WM, marge de l'aile ; vr, radius ventral ; dr, radius dorsal ; np, notopleural ; ps, présutural ; sa, supra-alaire ; pa, post-alaire ; dc, dorso-central ; sc, scutellaire.

l'absence des cofacteurs nécessaires à la liaison d'Esg et de N<sub>intra</sub>. Néanmoins je tiens à souligner que l'interaction entre Sna1 et Nintra dans les cellules d'hépatocarcinome est directe. De ce fait, même si je ne peux pas totalement l'exclure, je tendrais à rejeter l'hypothèse qu'une interaction physique directe serait le mécanisme par lequel Esg et Scrt interagissent avec la voie Notch. Un moyen de confirmer ce point serait de modifier le rapporteur de l'activité Notch en remplaçant les sites de fixations de Grainyhead par ceux d'activateurs de la voie Notch actifs dans le lignage.

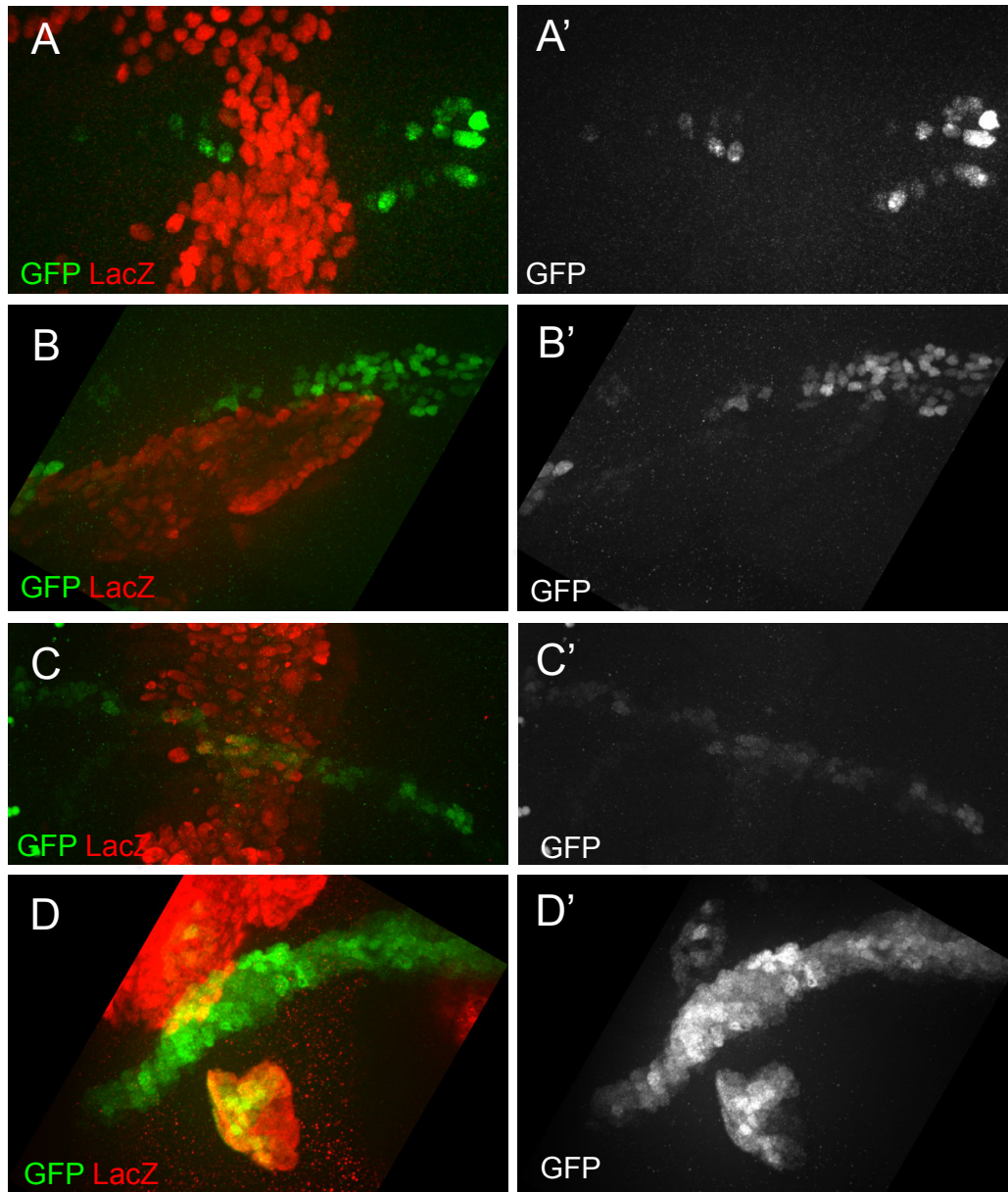
#### **4. Escargot diminue la réponse transcriptionnelle induite par l'activation de la voie Notch**

L'interaction d'Esg, Scrt et la voie Notch ne reposant pas sur une interaction directe entre ces facteurs, une autre possibilité est qu'Esg et Scrt inhibent l'expression des gènes cibles de Notch. Comme décrit dans l'introduction (voir introduction chapitre II.1.3.a), les gènes cibles de Notch les plus connus et les mieux caractérisés sont ceux codant les protéines du complexe Enhancer of split (E(spl)). L'analyse de leur expression en contexte de surexpression d'Esg devrait donc permettre de déterminer si les facteurs de la superfamille Snail sont capables d'inhiber la réponse transcriptionnelle induite par l'activation du signal Notch. Pour se faire, j'ai utilisé des lignées possédant un rapporteur de l'expression de gènes du locus *E(spl)*. Ces rapporteurs sont constitués du promoteur complet d'un des gènes *E(spl)* en aval de la séquence codant GFP ou LacZ. Ainsi j'ai analysé le profil d'expression des rapporteurs des gènes *E(spl)m4*, *E(spl)m6*, *E(spl)m8*, *E(spl)mα*, *E(spl)mβ* et *E(spl)mγ* dans le disque d'aile et les organes mécanosensoriels. Concernant les rapporteurs de *E(spl)m6* et *E(spl)mβ*, ils ne sont exprimés pas exprimés dans le disque d'aile ou le notum.

Dans le disque d'aile, les rapporteurs des gènes *E(spl)m4*, *E(spl)m8* et *E(spl)mα* sont exprimés. Pour orienter le disque d'aile lors de cette analyse, la frontière antéro-postérieure a été mise en évidence grâce à l'expression de la construction *dpp>lacZ* (en rouge). Ceci m'a permis également de définir les différentes régions du disque et les différents organes sensoriels (Fig.43A).

L'expression du rapporteur *E(spl)m4>GFP* dans le disque d'aile débute à la fin du 2<sup>ème</sup> stade larvaire (Fig.43B). Dans la région charnière, il est exprimé au niveau de l'organe sensoriel du radius dorsal et ventral (Fig.43B, indice dr et vr) et dans un amas de cellules du bord antérieur correspondant aux futurs organes de la région notopleural et présutural (Fig.43B, indice np et ps). Dans la région alaire, le rapporteur est





**Figure 44 : Esg réprime l'expression de *E(spl)m4* et *E(spl)mα* mais pas celle de *E(spl)mβ* dans le disque d'aile.**

Effet de la surexpression d'Esg sur l'expression des rapporteurs (en vert et en niveaux de gris) des gènes *E(spl)m4* (A-A'), *E(spl)mα* (B-C') et *E(spl)mβ* (D-D'). Les cellules surexprimant Esg sont marquées par la  $\beta$ -galactosidase (rouge). Noter que la surexpression d'Esg éteint l'expression de *E(spl)m4* et *E(spl)mα* dans les organes sensoriels (A-B') mais pas celle de *E(spl)mα* dans la marge de l'aile (C-C') ni celle de *E(spl)mβ*.

majoritairement exprimés dans les cellules de part et d'autre de la frontière dorso-ventral où seront produits les organes du bord de l'aile (Fig.43B, indice WM) et dans la région dorsale de la frontière antéro-postérieure (identifiée ici en rouge grâce à *ddp>lacZ*). Finalement le rapporteur *E(spl)m4>GFP* n'est pas exprimé dans la région du notum du disque d'aile.

Le rapporteur *E(spl)mα>GFP* est exprimé selon un profil similaire à *E(spl)m4* dans le disque d'aile (Fig.43C) sauf qu'il est également présent dans les organes sensoriels du scutellum, dorso-centraux et post-alaires (Fig.43C, indice sc, dc et pa). De plus, alors que dans la région alaire *E(spl)m4>GFP* n'est pas exprimé dans le compartiment postérieur, *E(spl)mα>GFP* est détectée le long de la frontière dorso-ventrale dans des disques de 3<sup>ème</sup> stade larvaire (Fig.43C, flèche).

Finalement le rapporteur *E(spl)m8>LacZ* est exprimé dans les organes sensoriels du radius dorsal et ventral ainsi que ceux de la marge de l'aile (Fig.43D, indice dr, vr et WM). De plus, tout comme *E(spl)mα*, son profil d'expression est détectée le long de la frontière dorso-ventrale dans le compartiment postérieur (Fig.43D, flèche).

La surexpression d'Esg dans les disques d'aile a été réalisée par la technique de clone de surexpression. En effet cette technique me permet d'analyser une population de cellules surexprimant Esg (identifiée par la présence de β-galactosidase) et de la comparer aux cellules contrôles adjacentes.

Pour *E(spl)m4>GFP*, la présence d'Esg éteint son expression. En effet, dans les organes sensoriels où ce rapporteur est exprimé, la présence de clones induit une absence de GFP (Fig.44A-A'). Ces résultats montrent que la surexpression d'Esg modifie le profil d'expression du rapporteur de *E(spl)m4* dans le disque d'aile. De plus cela suggère qu'Esg est capable de réprimer l'expression du gène *E(spl)m4*.

Tout comme *E(spl)m4*, l'expression du rapporteur de *E(spl)mα* dans les organes sensoriels est éteinte dans un contexte de surexpression d'Esg (Fig.44B-B'). Par contre, dans les cellules présentes le long de la frontière dorso-ventrale du compartiment postérieur et qui ne sont pas des organes sensoriels, l'expression de *E(spl)mα>GFP* n'est pas affectée par la surexpression d'Esg (Fig.44C-C'). Mes données indiquent qu'Esg est capable de réprimer l'expression de *E(spl)mα* et suggèrent que la capacité d'Esg à moduler l'expression de gènes cibles de Notch dépend du type cellulaire.

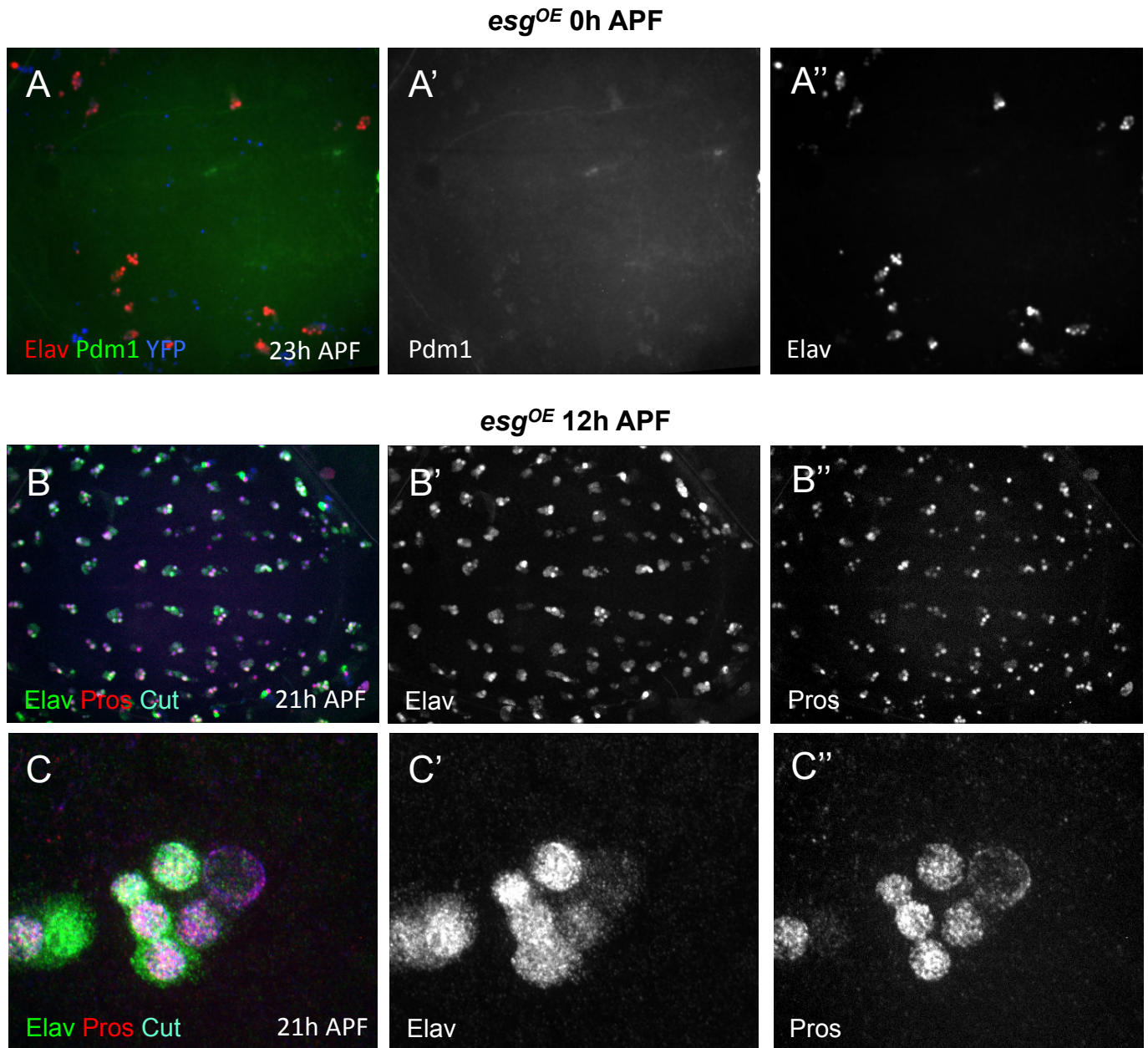


Finalement, contrairement au deux précédents, la surexpression d'Esg n'affecte pas l'expression de ce rapporteur quelque soit le type cellulaire (Fig.44D-D'), indiquant qu'Esg ne peut pas influencer l'expression de tous les gènes cibles de Notch.

En résumé, la surexpression d'Esg dans le disque d'aile modifie l'expression de gènes cibles connus de la voie Notch, suggérant qu'Esg est capable de diminuer voir d'inhiber la réponse transcriptionnelle lors de l'activation de la voie Notch. Puisque dans ces expériences, les promoteurs complets des gènes *E(spl)* régulent l'expression du gène rapporteur, alors leur promoteur doivent contenir une séquence permettant la fixation d'Esg sur l'ADN. Une analyse *in silico* des promoteurs de *E(spl)m4* et *E(spl)mα* montre la présence de E-box, la séquence de fixation des facteurs de la superfamille Snail (respectivement 323 et 525 nucléotides en amont de l'ATG, observation personnelle et Maeder et al., 2005). Ceci suggère qu'Esg pourrait être capable de se fixer en amont de ces gènes et de réguler leur expression. Par ailleurs, je n'ai pas identifié de E-box dans le promoteur du gène *E(spl)m8*. Cette absence de site de fixation pour Esg pourrait expliquer pourquoi la surexpression de ce facteur n'a pas d'effet sur l'expression du rapporteur *E(spl)m8>lacZ*.

En conclusion, Esg serait capable d'inhiber la réponse transcriptionnelle induite par l'activation de la voie Notch dans le disque d'aile. Qu'en est-il dans les organes mécanosensoriels ? Esg et Scrt pourraient-ils « verrouiller » l'identité pIIb en empêchant l'expression des gènes cibles de Notch lors de l'activation ectopique de la voie dans cette cellule ? Ainsi ils rendraient les cellules pIIb non compétentes pour répondre au signal Notch. Afin de tester cette hypothèse, il serait nécessaire d'analyser dans les organes mécanosensoriels si Esg est capable comme dans le disque d'aile de réprimer l'expression de rapporteurs de gènes cibles de la voie Notch. Dans le notum, les trois rapporteurs utilisés dans les expériences précédentes ainsi que *E(spl)mγ>lacZ* sont exprimés. Alors que *E(spl)m4* et *E(spl)mα* sont exprimés en bandes dans les cellules épithéliales (non montré et Fig.43E respectivement), reflétant probablement le processus d'inhibition latérale, *E(spl)m8* et *E(spl)mγ* sont majoritairement présents dans les organes mécanosensoriels (Fig.43F et 43G). Plus particulièrement *E(spl)mγ* est un candidat très intéressant puisque qu'il est présent uniquement dans les cellules du lignage où la voie Notch est activée (Fig.43G). De plus, une E-box a été identifié dans le





**Figure 45 : L'expression ectopique d'Esg dans le lignage des soies provoque une transformation vers l'identité neurale mais également des divisions ectopiques et une mort cellulaire accrue**

Surexpression d'Esg à partir de 0h APF (A-A'') et à partir de 12h APF (B-C''). La surexpression d'Esg est assurée par *neuralized<sup>P72</sup>>gal4* et la temporalité de l'expression est contrôlée par une forme thermosensible de Gal80, l'inhibiteur de Gal4. Les organes sensoriels sont identifiés par la présence de His2B::YFP (bleu en A-A'') et Cut (bleu en B-C''), les cellules externes par Pdm1 (vert en A et niveaux de gris en A'), les neurones par Elav (rouge en A, vert en B et C, niveaux de gris en A'', B' et C') et les cellules gaines par Pros (rouge en B et C, niveaux de gris en B'' et C''). Noter que la surexpression d'Esg induit la formation d'organes composés uniquement de cellules internes (neurone et gaine). De plus la surexpression à 0h APF aboutit à la disparition d'organes sensoriels et celle à 12h APF à des divisions ectopiques (B-C'') avec des organes allant jusqu'à plus de 6 cellules (C-C'')

promoteur du gène *E(spl)my* (396 nucléotides en aval du codon initiateur de la traduction). L'analyse de l'effet de la présence d'Esg sur le profil d'expression de ces rapporteurs devrait indiquer si dans le notum Esg est capable d'empêcher l'expression de gènes cibles de Notch.

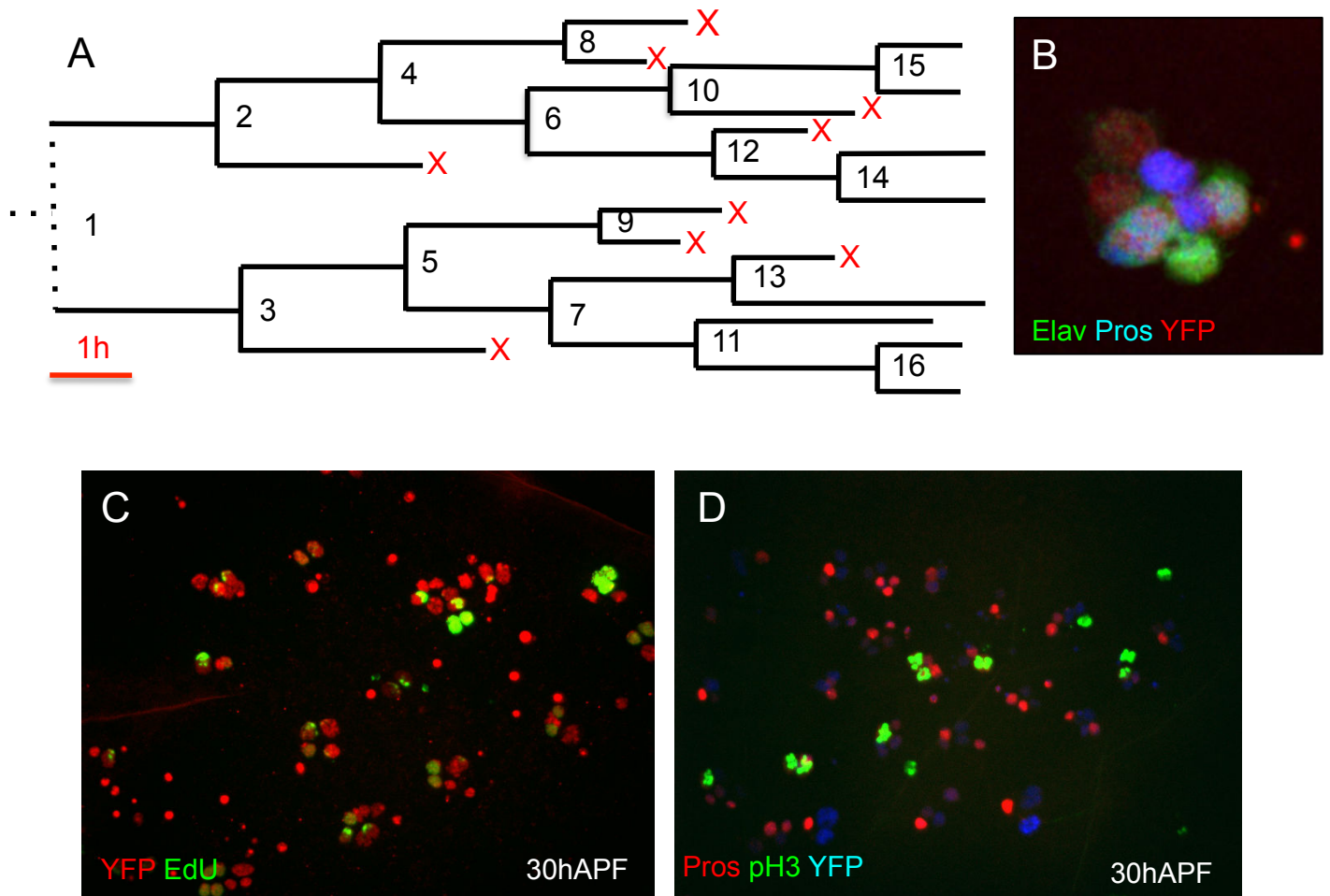
Mes données apportent des éclaircissements sur le mécanisme d'interaction entre facteur Snail et la voie Notch même si le mécanisme moléculaire en jeu, autrement dit comment Esg et probablement Scrt répriment l'expression des gènes cibles, reste encore inconnu.

Pour résumer ce chapitre, mes données suggèrent qu'Esg et Scrt permettent le maintien de l'identité pIIb en rendant cette cellule incapable de répondre transcriptionnellement suite à l'activation du signal Notch. Néanmoins cette hypothèse reste à confirmer par une analyse de la répression par Esg de l'expression des rapporteurs dans le notum et également par une approche moléculaire pour confirmer la fixation d'Esg et Scrt en amont des ces gènes.

### **III. Escargot module le cycle et la survie cellulaires dans le lignage des soies mécanosensorielles.**

Lors des différentes expériences de surexpression d'Esg et Scrt, j'ai fréquemment observé la formation de cellules neurales ectopiques notamment lorsque cette surexpression était maintenue durant toute la durée de la formation du lignage des soies. Sachant que les facteurs de la famille Snail ont été décrit comme participant à la régulation du cycle cellulaire au cours du développement (voir introduction, chapitre IV.2.2), ces observations m'ont conduit à analyser si l'augmentation du niveau de Esg et Scrt pouvait conduire à des divisions ectopiques.

La surexpression d'*esg* dans les organes mécanosensoriels dès le début de la métamorphose (en utilisant *neuralized>Gal4 tubuline>Gal80<sup>ts</sup>*, mis à 30°C 0hAPF) aboutit à la formation de nota présentant de larges zones dépourvues d'organes sensoriels (Fig.45A-A''). Néanmoins dans les organes restants correspondaient à des amas de cellules (allant jusqu'à plus de 8 cellules) exprimant pour la plupart Elav et aucune cellule exprimant le marqueur de cellule externe Pdm1. Cette observation montre que la surexpression continue d'*esg*, en plus de la transformation d'identité décrite précédemment, induit des divisions ectopiques. De même elles suggèrent que la



**Figure 46 : L'expression ectopique d'Esg provoque de nombreuses divisions ectopiques**

(A) Schéma du lignage d'un organe surexprimant Esg à partir de 12h APF. Noter que les cellules de cet organe se divisent 16 fois au lieu de 4 et qu'il y a de 9 cellules qui meurent (croix rouges). (B) Organe obtenu à partir du lignage décrit en A. (D-E) Analyse des phases du cycle à 30h APF dans des organes sensoriels surexprimant Esg. La phase S est identifiée grâce à l'incorporation de EdU (vert en C) et la phase M par les HistonesH3 phosphorylées (vert en D). Noter que les cellules du lignages (identifiées par Cut, rouge en C et bleu en D) sont toujours en cours de division à 30h APF, alors que dans un contexte contrôle les divisions s'arrêtent à 21h APF.

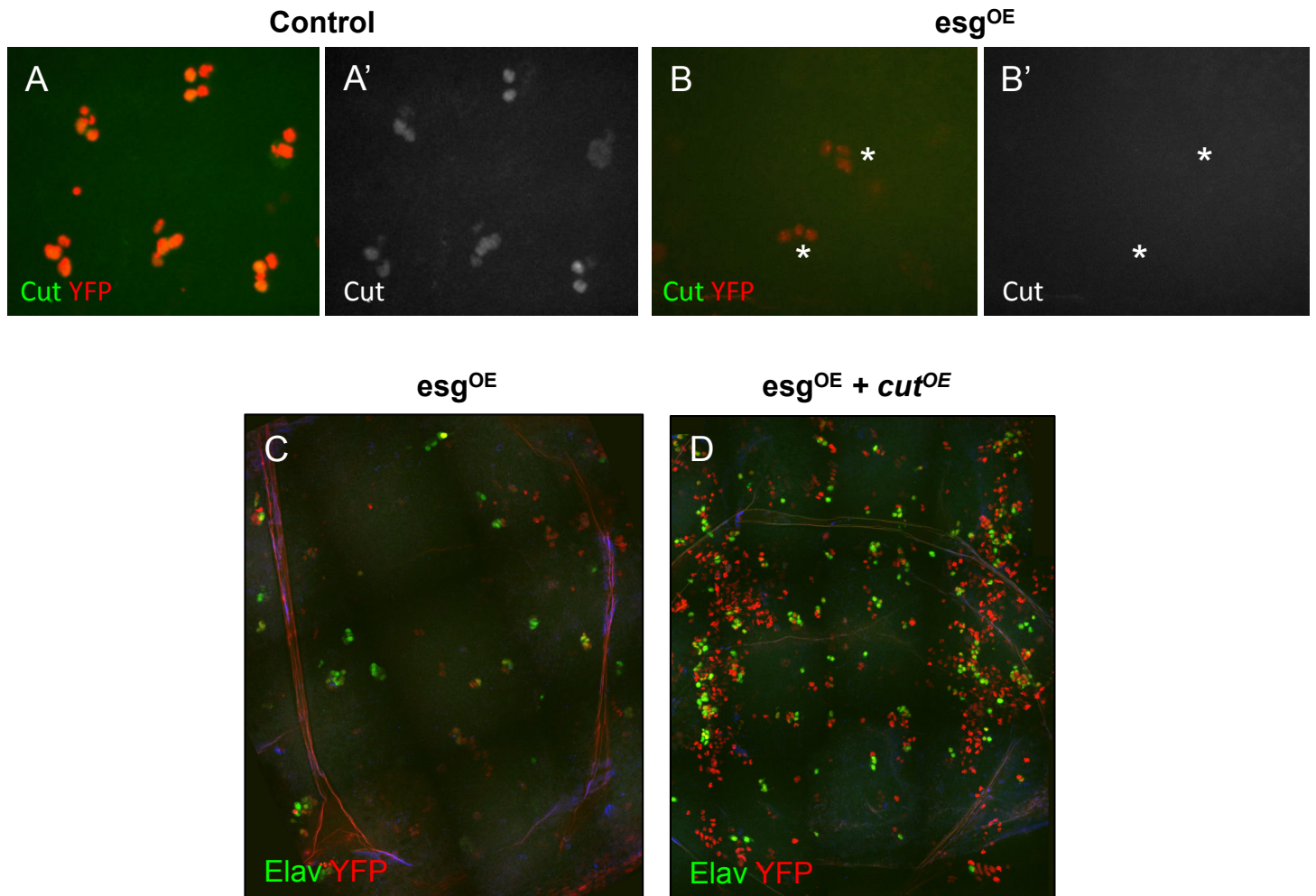
surexpression provoque une mort cellulaire accrue conduisant à la disparition d'organes sensoriels. Lorsque la surexpression est plus tardive (en utilisant *neuralized>Gal4 tubuline>Gal80<sup>ts</sup>*, mis à 30°C 12hAPF) je n'observe plus de régions dépourvues d'organes sensoriels mais les organes présentent toujours une augmentation du nombre de cellules de cellules et un biais vers l'identité neurale (Fig.45B-C'').

### **1. La surexpression d'*escargot* provoque de nombreuses divisions ectopiques**

Afin d'analyser plus en détail les conséquence de la surexpression d'*esg*, j'ai effectué une analyse *in vivo* permettant de suivre le lignage cellulaire. Concernant les divisions ectopiques, j'ai constaté de nombreuses divisions ectopiques dans un contexte de surexpression d'Esg. Dans un exemple où Esg est surexprimé à partir de 12hAPF, j'ai dénombré jusqu'à 16 divisions au lieu des 4 habituelles (Fig.46A). Les cellules obtenues dans ces organes expriment toutes les marqueurs d'identités neurales Elav et Pros (Fig.46B). Ces divisions ectopiques se poursuivent bien au-delà de ce que j'ai pu observé dans l'analyse *in vivo* puisqu'à 30hAPF j'observe toujours dans les amas de neurones et de cellules gaines des cellules en cours de réplication ou de mitose (respectivement détectées par incorporation de Edu un marquage de l'histone H3 phosphorylée, Fig.47C et 47D).

En résumé la surexpression d'Esg semble maintenir les capacités prolifératives des cellules du lignage. Ce facteur pourrait avoir un effet direct sur la progression du cycle cellulaire ou bien à un maintien de l'identité précurseur (pIIb ou pIIIb). Esg et Scrt promouvant l'identité pIIb et la perte de fonction *esg* n'affectant pas la cadence des divisions cellulaires, la seconde hypothèse semble la plus probable. Néanmoins les facteurs de la famille Snail sont des régulateurs du cycle cellulaire dans de nombreux systèmes (Fuse et al., 1994 ; Hayashi, 1996 ; Nakayama et al., 1998). Ainsi je ne peux pas totalement écarter un rôle sur la progression du cycle cellulaire. Mais il faut garder à l'esprit que ces expériences sont des surexpressions d'Esg, pouvant entraîner la régulation de l'expression de gènes qui ne sont pas des cibles transcriptionnelles d'Esg dans le lignage.





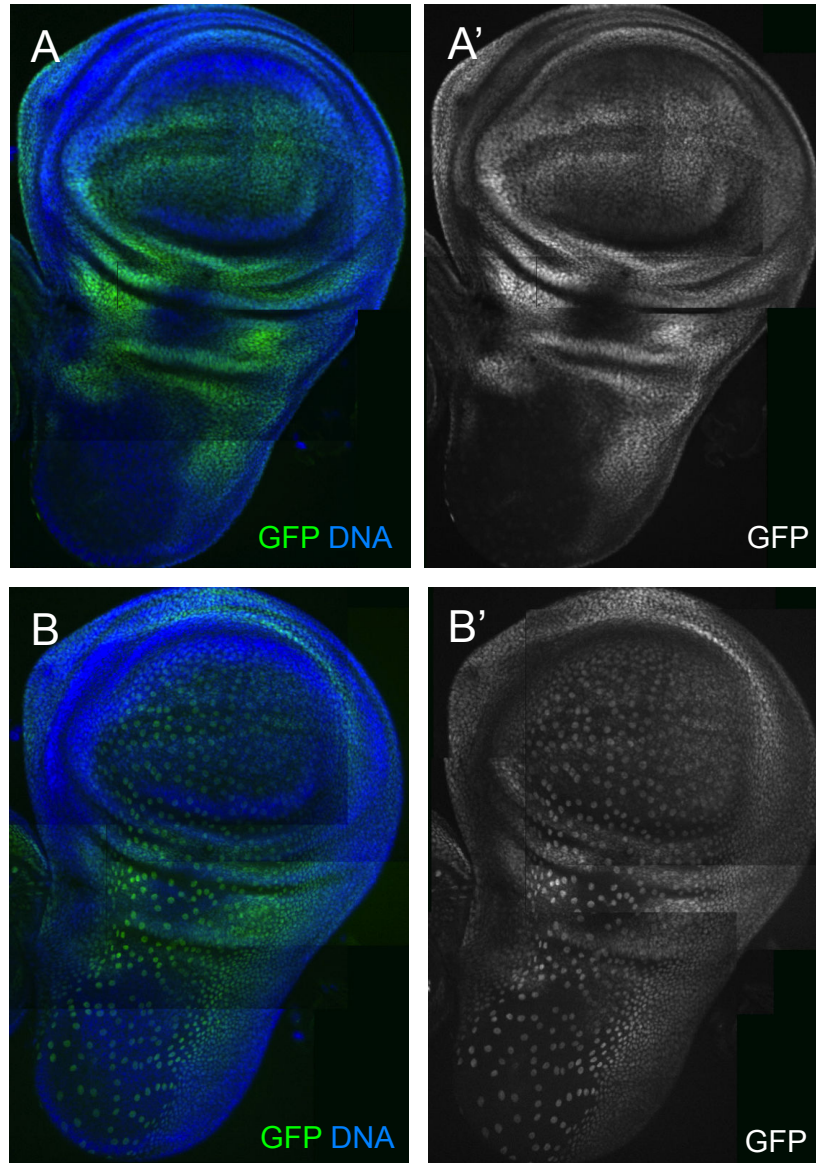
**Figure 47 : Cut réprime l'apoptose provoquée par la surexpression d'Esg**

(A-B') Expression de Cut (vert en A et B, niveaux de gris en A' et B') dans le cellule du lignage d'organes contrôles (A-A') et surexprimant Esg à partir de 0h APF (B-B'). La surexpression est réalisée avec *neuralized<sup>p72</sup>>gal4* et son expression est visualisée grâce à UAS-His2B::YFP (rouge en A et B). Noter que les cellules surexprimant Esg ne sont marquées par Cut alors que la YFP est détectée (astérisques). (C-D) Notum où les organes sensoriels surexpriment Esg seul (C) ou Esg et Cut (D). La surexpression est réalisée avec *neuralized<sup>p72</sup>>gal4* et son expression est visualisée grâce à UAS-His2B::YFP (rouge). Les neurones sont identifiés par Elav (vert). Noter que le nombre de cellules appartenant au lignage des soies augmente dans un contexte de surexpression d'Esg et Cut comparé à la surexpression d'Esg seul.

## 2. La surexpression d'*escargot* provoque-t-elle une mort cellulaire accrue en réprimant l'expression du facteur Cut ?

Dans l'exemple cité plus haut, bien que 16 divisions soit observées, toutes les cellules produites ne composent pas l'organe final. En effet, 9 cellules meurent juste après leur formation. Ces cellules meurent-elles parce qu'elles ont adopté l'identité de cellule gliale ? Comment la surexpression d'Esg provoque-t-elle la mort de ces cellules ? Le facteur de transcription Repo est un marqueur de l'identité gliale. Or dans un contexte de surexpression d'Esg, je ne détecte pas la présence de ce marqueur dans les cellules en cours d'apoptose (résultat non montré). Ceci indique que les cellules entrant en apoptose dans ce contexte ne sont pas des cellules gliales. Corréliées aux conclusions émises à la fin de la section précédente, elles indiquent également que la surexpression d'Esg ne provoque pas des divisions ectopiques suite à un maintien de l'identité pIIb, la cellule mère de la cellule gliale.

De manière intéressante, lors de la surexpression d'Esg dès le début du lignage (en utilisant *neuralized>Gal4 tubuline>Gal80<sup>ts</sup>*, mis à 30°C 0hAPF), j'observe que les organes sensoriels n'expriment plus le facteur de transcription Cut (Fig.47B-B' à comparer avec Fig.47A-A'), suggérant qu'Esg réprime l'expression de *cut*. Or ce facteur est présent dans toutes les cellules du lignage et est couramment utilisé comme marqueur des cellules du lignage. Une étude précédente a montré que la perte de fonction *cut* conduit à une augmentation de l'apoptose (Pitsouli et Perrimon, 2010). La disparition de Cut est-elle responsable de la mort cellulaire observée lors de la surexpression d'Esg ? Pour répondre à cette question, j'ai restauré l'expression de Cut dans un contexte de surexpression d'Esg. Dans ce contexte, j'observe une forte augmentation du nombre de cellules, majoritairement de part et d'autres de la ligne médiale, formant de larges amas de cellules exprimant pour certaine le facteur Elav (Fig.47D à comparer avec Fig.47C). Il est important de noter que la surexpression de Cut seul ne modifie pas la formation des organes sensoriels (résultat non montré). Ces résultats montrent que la restauration de l'expression de Cut diminue la mort cellulaire induite par la surexpression d'Esg sans toutefois affecter les divisions ectopiques ou la transformation d'identité. De plus ils suggèrent que la mort cellulaire est une conséquence de la répression de *cut* par Esg. Toutefois, dans cette hypothèse, lors de la perte de fonction *esg*, je devrais observer une augmentation de l'expression de *cut*. Or, lors des expériences de perte de fonction *esg* et *esg/scrt*, je n'ai pas observé de modification du niveau d'expression de Cut dans les



**Figure 48 : Expression d'*esg* dans le disque d'aile de drosophile**

Expression d'*esg* (vert et en niveaux de gris) dans le disque d'aile au niveau de la poche et du notum (A-A') et au niveau de la membrane péripodiale (B-B'). Noter qu'*esg* est exprimé à la charnière du disque d'aile, dans la poche de l'aile et dans les cellules de la membrane péripodiale.

organes sensoriels mutants (voir dans les résultats, chapitre I.1), indiquant que là encore la régulation de l'expression de *cut* par Esg découlerait d'une action ectopique de ce facteur.

En conclusion de ce chapitre, la surexpression d'Esg, en plus de provoquer un biais vers l'acquisition de l'identité neurale, induit des divisions ectopiques et une mort cellulaire accrue. Néanmoins, des effets sur le cycle et la survie cellulaires n'ayant pas été observé lors des expériences de perte de fonction *esg* et *scrt*, je tendrais à considérer que ces phénotypes sont la conséquence d'une augmentation drastique du niveau d'Esg conduisant à une saturation et à la régulation de l'expression de gènes qui ne sont pas des gènes cibles lorsqu'Esg est présent à plus faible niveau. Par ailleurs, ces expériences soulignent l'importance du contrôle du niveau d'expression d'*esg* dans les organes mécanosensoriels et dans d'autres systèmes.

#### **IV. Escargot et la morphogenèse cellulaire dans le disque d'aile et les soies mécanosensorielles**

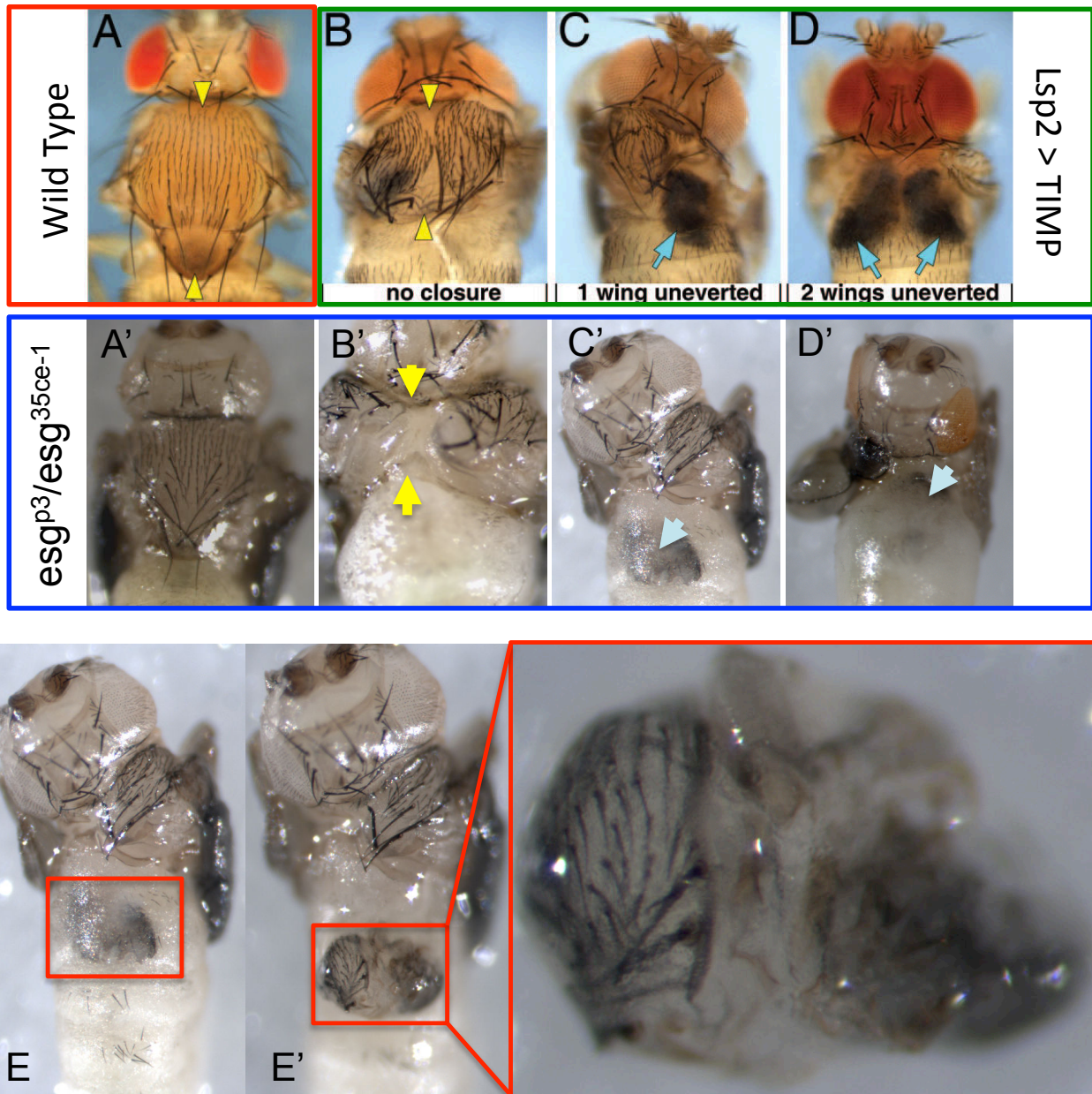
Les organes mécanosensoriels sont formés au stade pupal. Néanmoins le processus d'inhibition latérale conduisant à leur sélection débute dès le stade larvaire dans la partie notum du disque d'aile. Comme décrit dans l'introduction (voir chapitre II.2.1), la sélection par inhibition latérale des organes sensoriels repose sur une activation différentielle de la voie Notch entre les cellules précurseurs du futur organe sensoriel et les cellules épithéliales adjacentes. Dans le but de savoir si Esg et Scrt pourraient également intervenir dans ce processus, notamment en interagissant avec la voie Notch, j'ai analysé le profil d'expression d'*esg* et *scrt* dans le disque d'aile.

##### **1. Expression d'*escargot* et *scratch* dans le disque d'aile**

Concernant l'expression de *scrt*, en utilisant la lignée enhancer-trap utilisée dans mes précédentes expériences, je n'ai pas pu détecter d'expression de ce gène dans le disque d'aile (résultat non montré).

En utilisant la lignée *esg::GFP*, j'ai observé que le gène *esg* est fortement exprimé dans les cellules constituant la charnière entre la poche de l'aile et le notum, plus faiblement dans la poche de l'aile mais aucune expression n'est visible dans le notum (Fig.48A-A'). Cette absence d'expression dans le notum du disque d'aile indique qu'il est





**Figure 49 : Esg est impliqué dans l'éversion du disque d'aile et de la fermeture dorsale**

Thorax de pharates contrôle (A), dans un contexte d'inhibition de l'éversion du disque d'aile (A-D) et hypomorphe *esg* (A'-D'). Noter que les mouches hypomorphes *esg* présentent des phénotypes similaires à ceux observés lors d'un blocage de l'éversion du disque d'aile comme une absence de fusion thoracique (B et B'), d'une moitié du thorax (C et C') ou du thorax entier (D et D'). Lors de l'absence d'une moitié du thorax, celle-ci est présente à l'intérieur du corps de la mouche (E-E').

Les photographies de A à D sont extraites de Srivastava et al., 2007.

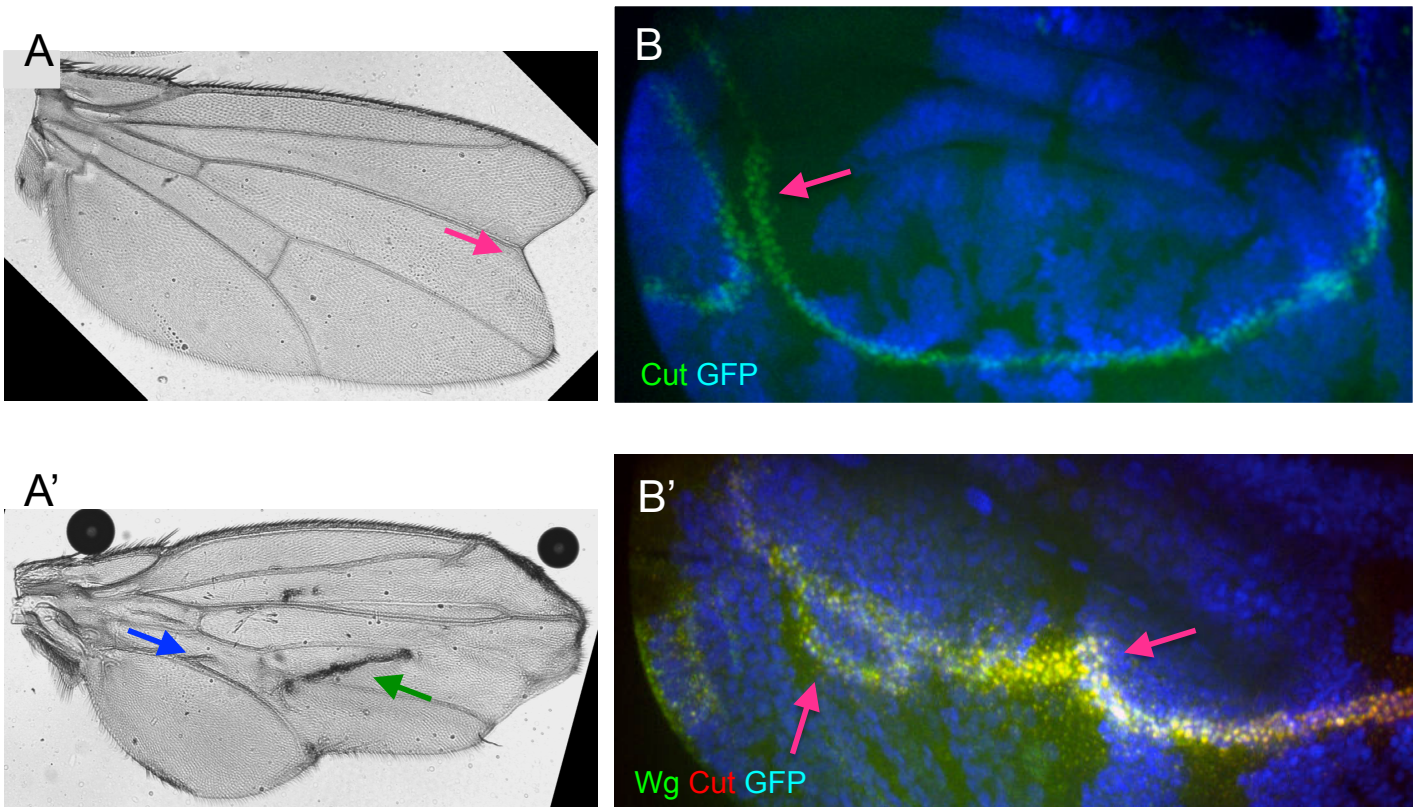
peu probable qu'Esg joue un rôle dans la sélection des organes sensoriels. A un niveau plus apical j'ai également détecté Esg::GFP dans les cellules de la membrane péripodiale, un tissu important lors de l'éversion du disque d'aile (Fig.48B-B'). Ces observations indiquent qu'Esg pourrait jouer un rôle lors de la formation du disque d'aile et lors de son eversion.

### **1. Escargot est impliqué dans l'éversion du disque d'aile et la fermeture thoracique**

La combinaison hétéroallélique *esg*<sup>35ce-1</sup>/*esg*<sup>P3</sup> permet aux individus de survivre jusqu'au stade pupal. Ces mouches, comme décrit dans une précédente étude (Hayashi et al., 1993), présentent un défaut dans le maintien des histoblastes corrélée à une absence de soies abdominales, une augmentation du nombre de segments dans la patte et une mauvaise orientation des ailes au repos.

Cependant dans ce contexte, j'ai également observé un phénotype non décrit jusqu'à maintenant. Si les soies thoraciques apparaissent normales, la moitié des pharates (n=229) présentent de sévères défauts au niveau du thorax. Certaines pupes sont complètement déformées alors que d'autres (n=52) présentent des phénotypes moins drastiques : 10% présentent un défaut de fermeture thoracique (Fig.49B'), 69% ont une moitié de thorax absente (Fig.49C') et 21% n'ont pas de thorax dorsal (Fig.49D'). De manière intéressante, dans les mouches ne présentant pas de thorax ou seulement une moitié de thorax, la partie manquante est toujours présente à l'intérieur du corps de l'individu (Fig.49E-E'). En disséquant ces individus j'ai pu voir que ces « thorax internes » sont normalement formés avec une aile adjacente et ils présentent même des soies mécanosensorielles parfaitement ordonnées (Fig.49E'). Un tel phénotype n'est pas sans rappeler ce qui est observé lors d'un blocage de l'éversion du disque d'aile par inhibition de la voie JNK dans les cellules de la membrane péripodiale (Fig.49A-D, Srivastava et al., 2007), suggérant qu'Esg est impliqué dans l'éversion du disque d'aile.

Pour résumer, Esg contribue à l'éversion du disque d'aile et à la fermeture dorsale permettant la formation du thorax. Aux vues de l'expression d'*esg* dans la membrane péripodiale et de son rôle connu dans l'initiation de la transition épithélio-mésenchymateuse (un processus utilisé lors de l'éversion du disque d'aile), mes données suggèrent qu'Esg contrôle la capacité des cellules de la membrane péripodiale à envahir la membrane basale et ainsi déclencher la sortie du disque d'aile. De même, la participation des cellules péripodiales lors de la fusion des deux hémi-thorax, la



**Figure 50 : La perte de fonction d'*esg* en contexte hétéroallélique *scrt* provoque une déformation de la marge dorso-ventrale**

(A-A') Ailes de mouches adultes en contexte de perte de fonction *esg* et hétéroallélique *scrt*. Noter la présence d'encoche dans la marge de l'aile (A, flèche rose), de marges ectopiques (A', flèche verte) et des défaut dans le trajet des veines alaires (A', flèche bleu). (B-B') Disque d'aile en contexte de perte de fonction *esg* par clones mitotiques et hétérozygote mutant *scrt*. La frontière dorso-ventrale est identifiée par l'expression de Cut (vert en B et rouge en B') et de Wingless (vert en B). Les cellules mutantes *esg* sont marquées par l'absence de GFP (bleu). Noter que la frontière dorso-ventrale est fortement déformée dans ce contexte (flèches).

diminution de dose d'*esg* dans ces cellules résulterait en un défaut de fermeture thoracique.

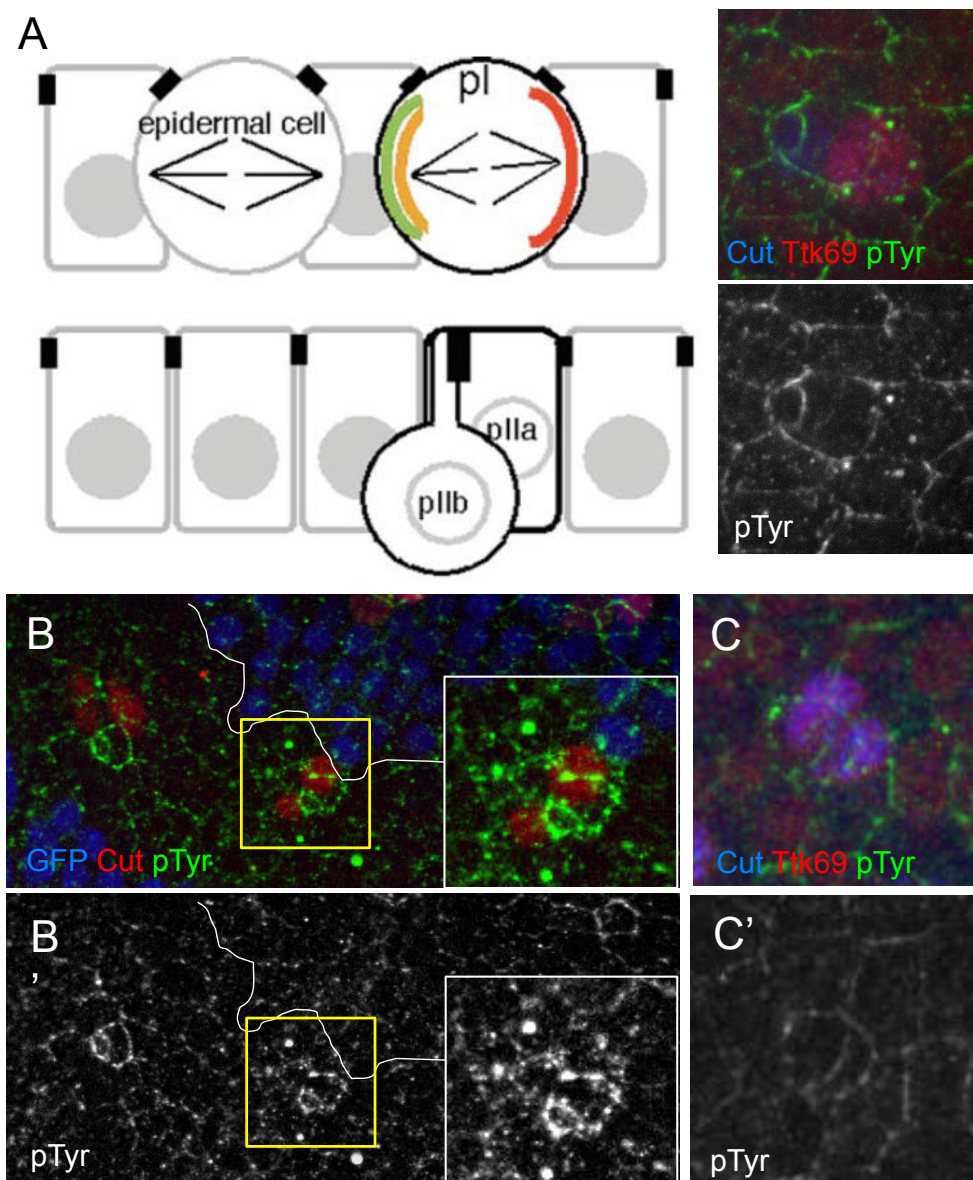
## 2. Escargot et Scratch régulent l'affinité cellulaire dans le disque d'aile

Lors de l'analyse clonale de la perte de fonction *esg* en contexte de diminution de dose de *scrt* (*scrt<sup>jo11/+</sup>* ou *scrt<sup>jo11/scrt<sup>jo16</sup></sup>*), j'ai observé que les ailes adultes étaient fortement déformées (Fig.50A-A'). Les ailes de ces mouches présentaient des encoches (Fig.50A, flèche rose), des marges ectopiques (Fig.50A', flèche verte), des « bulles » ainsi que des altérations dans le trajet des veines parcourant l'aile (Fig.50A', flèche bleue). Comme décrit dans l'introduction, les ailes à encoches sont une indication d'une diminution du signal Notch à la frontière dorso-ventrale. *A contrario*, les « bulles » et les marges ectopiques sont généralement le signe d'une activation ectopiques de Notch dans le disque d'aile. Mes travaux ayant montré qu'*Esg* et *Scrt* interagissent avec la voie Notch dans les organes mécanosensoriels, cette interaction est-elle conservée dans le disque d'aile ?

Pour répondre à cette question j'ai étudié au niveau cellulaire la formation de la marge de l'aile dans des clones mutants *esg* lors d'une diminution de dose *scrt*, notamment le profil d'expression de *Wg* et *Cut*. En effet ce sont deux facteurs dont l'expression est activée par la voie Notch dans les cellules de la frontière dorso-ventrale. La double perte de fonction *esg/scrt* n'induit pas de discontinuité dans l'expression de *Cut* et *Wg* le long de la frontière dorso-ventrale, comme ce serait le cas lors d'une perte de fonction *Notch*. Réciproquement, je n'observe pas d'extension de la marge ou d'expression de *Wg* et *Cut* dans les clones mutants, comme observé lors d'une activation ectopique de la voie Notch dans le disque d'aile. Néanmoins dans ce contexte la frontière dorso-ventrale présente de fortes déformations et forme des boucles vers le compartiment dorsal ou ventral (Fig.50B-B', flèches), générant probablement les encoches observées dans l'aile adulte. Il est à noter que ces boucles ne suivent pas en permanence la bordure clonale, indiquant que cette déformation n'est pas due à la juxtaposition des cellules mutantes et contrôles. Finalement, un phénotype apparaissant également est la formation de cercles exprimant *Cut* et *Wg* loin de la frontière dorso-ventrale. Ces anomalies pourraient correspondre aux « bulles » et aux marges ectopiques que l'on observe chez l'adulte.

Pour résumer, si la perte de fonction *esg/scrt* ne provoque pas les phénotypes associés à une modification de la voie Notch dans le disque d'aile, elle génère tout de





**Figure 51 : Esg n'est pas impliqué dans la morphogenèse de la cellule pIIb**

(A) Schéma des mouvements cellulaires de pIIa et pIIb. Noter que la cellule pIIb délamine, ne conservant en contact avec l'épithélium qu'une petite partie de sa région apicale. Ceci est visible par un marquage de la région apicale (pTyr en vert et en niveaux de gris) des cellules pIIb et pIIa. Les cellules du lignage sont identifiées par Cut (bleu) et la cellule pIIa par Tramtrack69 (rouge). (B) Clones mutants *esg*, identifiés par l'absence de GFP (bleu). Noter que la région apicale (pTyr en vert) de pIIa et pIIb (Cut en rouge) n'est pas affectée dans ce contexte. (C) Clones mutants *esg* en contexte hétéroallélique *scrt*. Noter que pour les organes où pIIb est transformée en pIIa (deux cellules positives pour Ttk69, en rouge), la région apicale des deux cellules correspond à de cellules n'ayant pas délaminer.

même une altération de la forme de la frontière corrélée au phénotype observés chez l'adulte. D'après ce qui a été décrit dans de précédentes études (Blair et al., 1994 ; Milan et Cohen, 1999), ce phénotype est très similaire à ceux obtenus lors d'une altération de l'affinité cellulaire et correspondant à un défaut d'affiliation des cellules au compartiment adéquat. Sachant que les facteurs de la superfamille Snail sont connus pour être des régulateurs de l'adhésion cellulaire, je propose que la perte de fonction *esg* et *scrt* dans le disque d'aile aboutirait à une modification de cette affinité, résultant en un mélange des différentes populations cellulaires et en une déformation de la frontière dorso-ventrale. N'ayant pas observé dans ce contexte une altération de l'expression de la E-cadhérine (résultat non montré), un cible directe des facteurs Snail, la régulation de l'affinité cellulaire par Esg et Scrt doit impliquer d'autres molécules d'adhésion qui reste à déterminer.

### **3. Escargot et Scratch ne contrôlent pas la morphogenèse des cellules pIIa et pIIb.**

Mes résultats indiquent qu'Esg et Scrt sont impliqués dans le contrôle de la morphogenèse cellulaire dans le disque d'aile. Cette fonction est-elle conservée dans le lignage des soies ? En terme de morphogenèse cellulaire, que ce soit pour le développement de la soie, de la cellule socle ou du neurone, le lignage présente une grande diversité de forme cellulaire. Néanmoins pour étudier si Esg et Scrt sont impliqués dans la modification de la forme des cellules du lignage, je me suis principalement concentrée sur les précurseurs pIIa et pIIb. En effet, alors que la cellule pIIa reste au niveau apical en contact avec l'épithélium, la cellule pIIb remodèle ces jonctions et délamine. En s'enfonçant vers l'intérieur de la puppe, elle ne conserve en contact avec l'épithélium qu'une petite partie de sa région apicale qui sera encerclée par celle de la cellule pIIa (Fig. 51A, Le Borgne et al., 2002).

Une analyse de la région apicale des précurseurs secondaires dans des clones mutants *esg* montre qu'il n'y a pas de modifications notables par rapport aux organes non mutants adjacents suggérant que la délamination de pIIb est normale dans ce contexte (Fig.51B-B'). Dans un contexte de perte fonction *esg* et *scrt*, j'observe que la région apicale des deux cellules transformées (identifiées par la présence de Tramtrack69) est large, indiquant qu'il n'y a pas eu délamination de la cellule antérieure (Fig.51C-C'). Cependant, en contexte de gain de fonction *Notch* où le précurseur pIIb acquiert l'identité pIIa, un phénotype similaire a été observé (Le Borgne et al., 2002). Il



n'est donc pas possible de déterminer si l'absence de délamination antérieure est causée directement par Esg et Scrt ou par la transformation de la cellule pIIb en pIIa. Toutefois, dans les organes non transformés présents dans ces clones, je n'ai pas observé de modification de la région apicale. Cette absence de modification suggère que l'acquisition de l'identité pIIa par la cellule antérieure serait responsable de son absence de délamination. De plus, cela suggère qu'Esg et Scrt ne sont pas impliqués dans la délamination de la cellule pIIb.

Pour conclure, bien qu'Esg et Scrt semblent contrôler la migration et l'adhésion des cellules du disque d'aile, dans les organes mécanosensoriels leur rôle semble être dédié au contrôle de l'identité neurale et neuronale. Néanmoins, sachant que la zone de contact entre pIIa et pIIb est un élément important pour l'établissement du signal Notch entre ces cellules, il n'est pas possible d'exclure qu'une absence de délamination de pIIb provoquée par la double perte de fonction *esg/scrt* soit responsable de l'activation ectopique de Notch dans la cellule pIIb, étant ainsi à l'origine de la transformation de cette cellule. Seule une analyse *in vivo* de la morphogenèse de pIIb et pIIa (en utilisant par exemple la protéine de fusion E-cadherin::GFP) en contexte de perte de fonction *esg* et *scrt* pourrait me permettre d'exclure un tel mécanisme.





# **Discussion des résultats**



Au cours de ma thèse, j'ai montré que deux facteurs de la superfamille Snail, Escargot et Scratch, sont exprimés dans le sous-lignage neural des organes mécanosensoriels de la drosophile. De plus mes résultats indiquent que, dans ce lignage, ces facteurs interviennent lors de la mise en place de l'identité neurale et neuronale : (i) dans les précurseurs secondaires, où Esg et Scrt, agissent de manière redondantes et sont nécessaires et suffisants pour maintenir l'identité du précurseur neural pIIb, probablement en bloquant l'expression de gènes cibles de la voie Notch, et (ii) dans le neurone, où Esg contrôle la dynamique de la détermination et de la différenciation de cette cellule en régulant l'expression de facteurs impliqués dans l'identité neuronale, notamment Prospero.

## **I. Mécanisme d'interaction entre Escargot, Scratch et la voie Notch**

Mes données montrent qu'une perte de fonction *esg* et *scrt* provoque dans 16% des organes la transformation de la cellule pIIb en pIIa. Or l'acquisition de l'identité pIIa est dépendante de l'activation de la voie Notch dans cette cellule (Guo et al., 1996). Par ailleurs, la fréquence de transformation de pIIb en pIIa observée lors d'une perte de fonction *esg* et *scrt* diminue ou augmente en fonction du niveau d'activation de la voie Notch (respectivement lors d'une augmentation et d'une diminution de l'activité de la voie). Ceci indique que ces facteurs interagissent génétiquement. De plus, cela suggère qu'Esg et Scrt maintiennent l'identité pIIb en empêchant l'activation de la voie Notch dans cette cellule.

De plus, mes travaux suggèrent qu'Esg agirait au niveau de la transduction du signal Notch, en maintenant réprimée l'expression de gènes cibles de la voie. Suite à cet ensemble de résultats, je propose que, dans le lignage des soies mécanosensorielles, Esg et Scrt agissent comme un « verrou » de l'identité neurale pIIb. Ils empêcheraient que cette cellule acquière un destin non-neural suite à une fluctuation supraliminale de l'activation de la voie Notch.

### **1. Répression des gènes cibles de Notch par Esg et Scrt**

La répression de l'expression des gènes cibles de la voie Notch par Esg pourrait être directe. Dans cette hypothèse, la fixation d'Esg et Scrt est requise au niveau de leur promoteur. J'ai montré qu'Esg est capable de modifier l'expression des gènes *E(spl)m4* et



*E(spl)mα*. De plus, une analyse *in silico* montre que ces gènes possèdent au moins un site de fixation pour Esg (E-box) quelques centaines de nucléotides en amont de leur promoteur. La répression de ces gènes dépend-elle de la fixation d'Esg sur ces séquences ? Dans le but de répondre à cette question, il serait nécessaire de générer des mutations ou des délétions de E-box dans les rapporteurs d'expression de *E(spl)m4* et *E(spl)mα* et d'analyser si leur expression est modifiée en présence d'Esg.

En complément de cette expérience, je propose de modifier le rapporteur minimal de l'activité de la voie Notch créé par Furriols et al., (2001) et qui n'est pas sensible à la surexpression d'Esg (Fig.42). Aux séquences déjà présentes dans le promoteur de ce rapporteur (site de fixation pour Grainyhead et Su(H)<sub>m8</sub>), j'ajouterai les séquences E-Box provenant du promoteur de *E(spl)m4*. Si la surexpression d'Esg provoque la répression de ce rapporteur, alors cela indiquera que ce processus est dépendant de la fixation d'Esg en amont des gènes cibles.

Mes résultats montrent que sur trois lignées comportant des rapporteurs d'expression des gènes cibles de Notch testées, Esg régulent l'expression de deux d'entre eux. Ces deux gènes sont-ils une exception ou est-il possible d'étendre cette interaction à d'autres gènes cibles de la voie Notch ? Des études montrent que l'activation de l'expression des gènes cibles de Notch est potentialisée par la fixation de facteurs de type bHLH comme Scute ou Daughterless sur des E-Box (Kramatschek et Campos-Ortega, 1994 ; Maeder et al., 2005). Par ailleurs, les facteurs Snail se fixant également sur des E-box (Mauhin et al., 1993), il a été montré qu'Esg peut entrer en compétition avec les protéines bHLH pour la régulation de l'expression des gènes cibles (Fuse et al., 1994 ; Kataoka et al., 2000). Il est donc envisageable qu'Esg et Scrt se fixent sur le promoteur des gènes cibles de la voie Notch et régulent directement leur expression. Pour tester ce point, il faudrait identifier les cibles transcriptionnelles d'Esg et Scrt et les comparer aux cibles de Notch. Dans ce but, il serait souhaitable de réaliser des expériences de séquençage de la chromatine immunoprécipitée (ChIP-seq) par Esg ou Scrt. La liste des gènes cibles d'Esg et Scrt serait ensuite comparée à celle des cibles de la voie Notch, obtenue par un séquençage de la chromatine liée avec N<sub>intra</sub>. Ceci permettra d'évaluer le pourcentage de cibles communes à Esg et la voie Notch. Des tests d'interaction génétique entre ces cibles, Esg et Scrt permettraient de déterminer si Esg et Scrt maintiennent l'identité pIIb en réprimant l'expression de ces gènes.



Finalement, je tiens à souligner que la majorité des expériences de surexpression visant l'analyse de l'interaction d'Esg et Scrt avec la voie Notch ont été réalisées uniquement avec Esg. Or un point central de mes données est que ces facteurs agissent de manière redondante dans ce processus. Il serait donc nécessaire de réaliser le même type d'expériences avec Scrt.

## **2. Mécanisme moléculaire de répression des gènes cibles de Notch par Esg et Scrt**

Par quel mécanisme Esg et Scrt agissent-ils sur l'expression des gènes cibles de Notch ? A l'instar des mécanismes potentialisant l'expression des gènes cibles de Notch (voir introduction chapitre II.3.2.a), il est possible d'envisager trois mécanismes conduisant à la répression des gènes cibles de Notch :

(i) Esg et Scrt pourraient bloquer la réponse transcriptionnelle à Notch en stabilisant la fixation du complexe répresseur sur l'ADN. La réponse à la voie Notch passe par un équilibre entre complexe répresseur et complexe activateur dans lesquels Su(H) est la protéine centrale (Krejci et al., 2007). Associée aux protéines CtBP, Hairless et Groucho, il forme le complexe répresseur qui se lie de manière transitoire et peu stable avec l'ADN (Krejci et al., 2007). Associée à N<sub>intra</sub> et Mastermind, il forme le complexe activateur, ayant une affinité beaucoup plus forte pour l'ADN et ainsi occupant de manière plus stable les sites de fixation pour Su(H) (Krejci et al., 2007). Krejci et al., ont montré qu'à partir de cellules où la voie Notch est activée, la quantité d'ADN immunoprécipité par Su(H) est beaucoup plus importante que celle obtenue à partir de cellules où la voie Notch n'est pas activée. La différence d'affinité pour l'ADN entre le complexe répresseur et le complexe activateur et le fait que le complexe répresseur n'est pas en permanence sur l'ADN expliqueraient pourquoi, lorsque la voie Notch est activée, l'expression des gènes cibles est rapidement activée.

Pour déterminer si Esg et Scrt augmentent l'affinité du complexe répresseur pour l'ADN, il serait nécessaire d'analyser si leur présence augmente la quantité d'ADN immunoprécipité par Su(H), ce qui refléterait la stabilisation du complexe répresseur.

(ii) Esg et Scrt pourraient bloquer la progression de l'ARN polymérase. Les facteurs Snail sont principalement connus pour leur rôle en tant que répresseur transcriptionnels. Ils agissent soit à courtes distances en bloquant la progression de l'ARN polymérase (Bothma et al., 2011) soit à de longues distances en inhibant le repliement de la chromatine et ainsi empêchant le rapprochement entre un promoteur





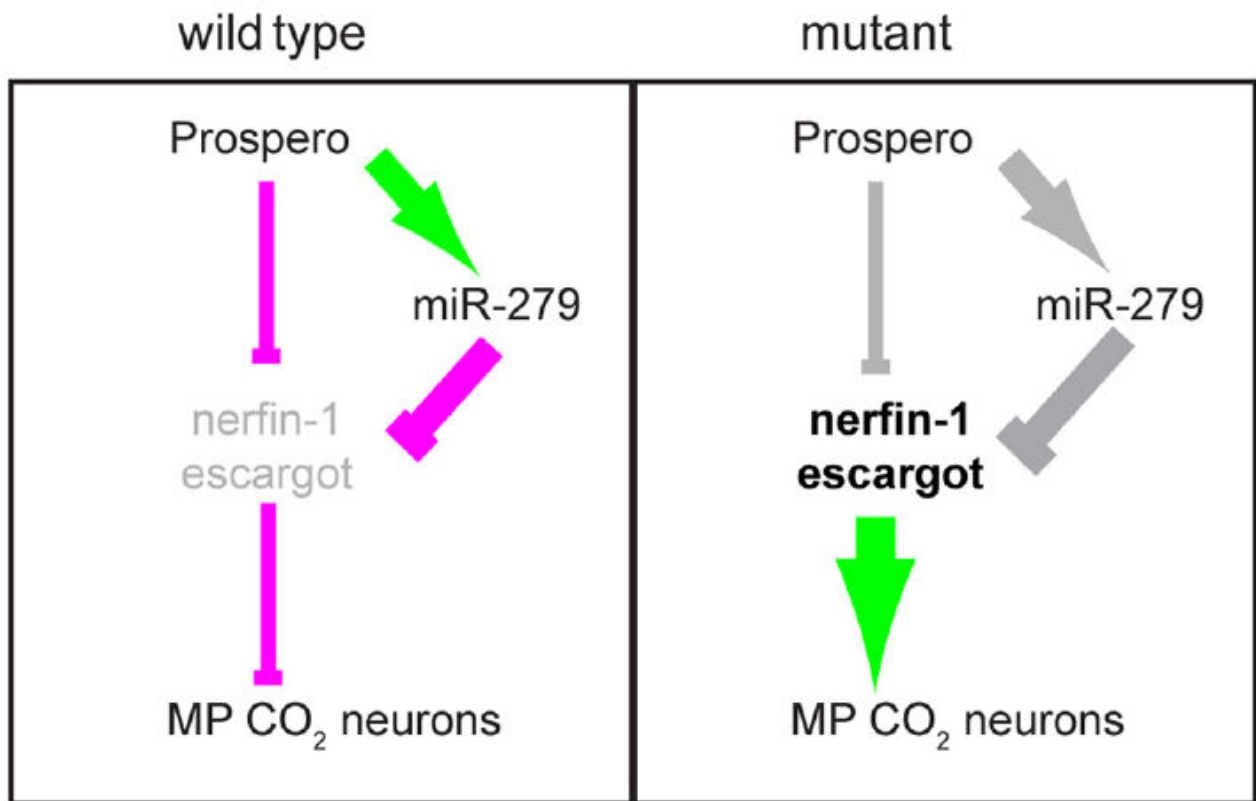
éloigné et une séquence codante (Chopra et al., 2012). Les gènes *E(spl)m4* et *E(spl)ma* possédant une séquence E-box moins de 500 paires de base en amont du codon d'initiation, il est probable qu'Esg régule leur expression en agissant sur de courtes distances via le mécanisme de blocage de la progression de l'ARN polymérase (Bothma et al., 2011).

(iii) Esg et Scrt modifieraient la structure de la chromatine, la rendant moins accessible à Nintra et au complexe activateur. Des travaux réalisés précédemment au laboratoire suggèrent que, lorsque la chromatine est sous un état plus fermée, la compétence cellulaire à répondre à l'activation de la voie est diminuée (Remaud et al., 2008). En accord avec cette idée, une diminution de la condensation chromatinienne en jouant sur les facteurs épigénétiques rendrait les cellules plus compétentes à répondre au signal Notch (Remaud et al., 2008). Sachant qu'Esg et Scrt s'associent avec des modificateurs de l'état chromatinien (Revue par Nieto, 2002), ces facteurs pourraient modifier l'état de la chromatine autour des gènes cibles de la voie Notch, empêchant leur expression lors de l'activation de la voie Notch. Il serait intéressant d'analyser si la diminution ou l'augmentation de dose des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine, tel que Brahma ou HP1, influence la transformation d'identité induite par la perte de fonction *esg* et *scrt*.

Enfin il est important de signaler que, bien que la littérature scientifique foisonne d'exemple de facteurs potentialisant l'expression des gènes cibles de Notch suite à une activation de la voie, il y a peu de facteurs décrits comme ayant des effets répressifs (Revue par Bray et Bernard, 2010). Mes travaux montrent qu'Esg, Scrt ont un effet répressif sur la voie Notch, permettant d'envisager un nouveau mécanisme participant à la régulation de la voie Notch.

## **II. Mise en place de l'identité neuronale : Réseau de régulation entre Escargot, Prospero, Nerfin-1, Elav et miR-279**

Au delà de l'implication d'Esg et Scrt dans le maintien de l'identité neurale, mes données montrent également que Esg, et non Scrt, a un rôle supplémentaire dans la différenciation neuronale. La perte de fonction *esg* altère la croissance et l'arborisation axonale, un phénotype non observé lors de la perte de fonction *scrt*. Par des analyses génétiques et cellulaires, j'ai mis en évidence que ces défauts de différenciation



**Figure 52 : Réseau d'interaction dans la cellule gaine des organes chémosensoriels sensibles au CO<sub>2</sub>**

Gauche : Dans la cellule gaine, Pros et miR-279 réprime l'expression d'*esg* et de *nerfin-1*. Cette répression permet la mise en place de l'identité gaine. Droite : Dans la cellule gaine d'organes mutant *pros*, *esg* et *nerfin-1* ne sont pas réprimés et activent la détermination et la différenciation neuronale. Ceci résulte en la formation d'un neurone ectopique.

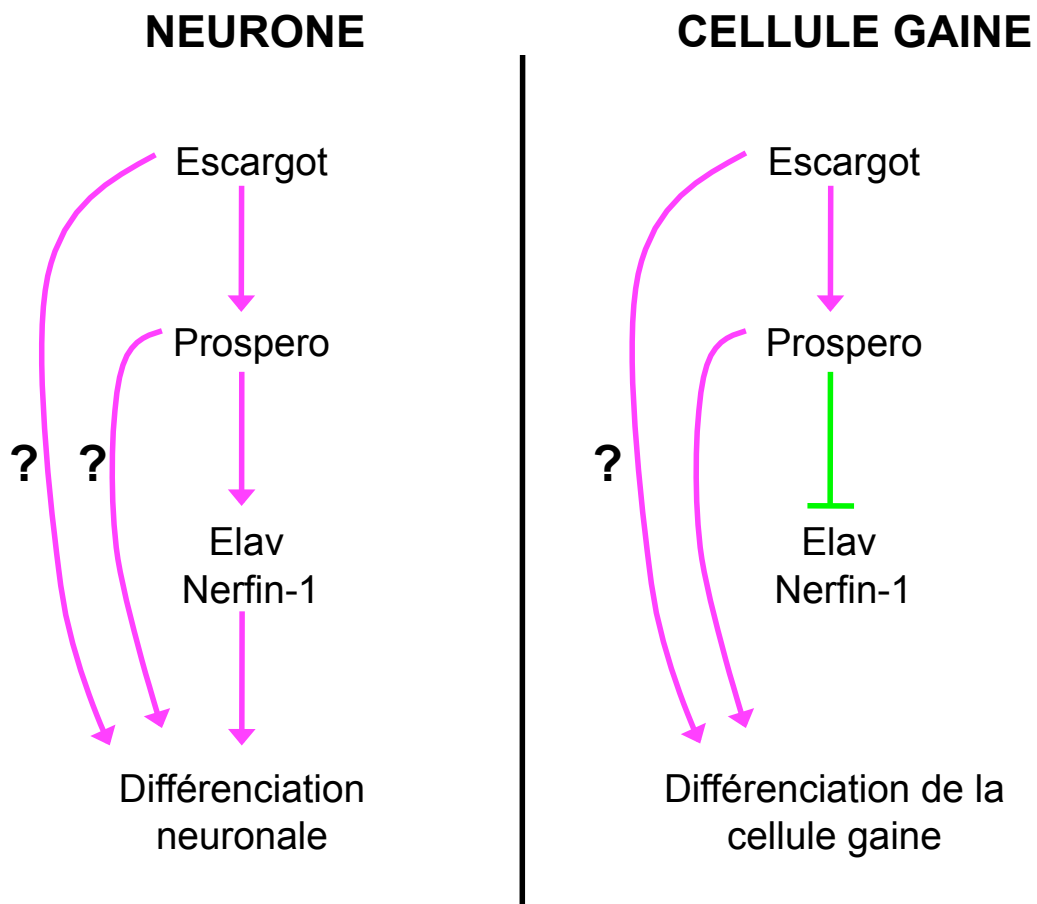
Schéma extrait de Hartl et al., 2011

neuronale résulte d'un délai dans la dynamique de la détermination neuronale, notamment en contrôlant la régulation de l'expression séquentielle des gènes *pros*, *nerfin-1* et *elav*. Plus particulièrement, l'effet d'Esg sur la détermination neuronale serait principalement médiée par la régulation de la dynamique d'expression de Pros, un facteur présent au début de la vie du neurone et qui joue un rôle crucial dans sa détermination et sa différenciation.

Chez la drosophile, Esg est impliqué dans la mise en place de l'identité neurale dans de nombreux types cellulaires (neuroblastes, photorécepteur). Un modèle proche des organes sensoriels est le lignage des organes chemosensoriels sensibles au CO<sub>2</sub>. Dans ces organes, Pros et miR-279 sont requis pour la détermination de la cellule gaine. En effet ils répriment l'expression d'*esg* et *nerfin-1*, deux facteurs promouvant l'acquisition de l'identité neuronale dans les neurones sensibles au CO<sub>2</sub>. En absence de Pros et miR-279, *esg* et *nerfin-1* ne sont plus réprimés dans la gaine et celle-ci devient un neurone (Hartl et al., 2011). Dans ce réseau de régulation, l'absence de Pros dans le neurone permettrait l'expression d'*esg* et *nerfin-1*. A leur tour, Esg et Nerfin-1 collaboreraient pour la mise en place l'identité neuronale (Fig.52). A l'inverse dans la gaine, Pros et miR-279 réprime l'expression de ces deux gènes, réprimant l'identité neuronale et permettant la mise en place de l'identité gaine.

Dans les organes mécanosensoriels, bien que les mêmes facteurs soient présents dans le neurone et la gaine, le réseau de régulation contrôlant la détermination neuronale ainsi que les interactions entre les différents facteurs sont totalement différents.

En premier lieu, Esg n'est pas une cible de Pros. En effet une analyse clonale de la perte de fonction *pros* montre que l'expression d'*esg* est similaire entre les organes mutants et contrôles et, de surcroît, dans la cellule gaine, *pros* et *esg* sont exprimés en même temps. A l'inverse mes données montrent que la dynamique d'expression de *pros* dans le neurone et la cellule gaine est affectée par la perte de fonction *esg*, indiquant que Pros serait une cible d'Esg. En outre, bien que Pros contrôle l'identité gaine comme dans les organes sensibles au CO<sub>2</sub>, c'est également un élément central de la détermination et de la différenciation neuronale dans les organes mécanosensoriels. En effet, la perte de fonction *pros* induit un défaut de l'acquisition de l'identité neuronale, notamment une diminution de l'expression d'*elav* et *nerfin-1*, ainsi qu'une forte perturbation de la



**Figure 53 : Réseau d'interaction dans le neurone et la cellule gaine des organes mécanosensoriels**

Gauche : Dans le neurone, Esg contrôle l'expression de *pros*. A son tour, Pros active l'expression de *elav* et *nerfin-1* et active la différenciation neuronale. Droite : Dans la cellule gaine Esg contrôle l'expression de *pros*. Celui-ci réprime l'expression d'*elav* et de *nerfin-1* et permet la différenciation de la cellule gaine.

différenciation neuronale. Finalement, bien que l'implication directe de Nerfin-1 dans la détermination neuronale n'ait pas été analysée lors de mes travaux, un test d'interaction génétique avec Esg suggère que ces facteurs ne collaborent pas pour initier la différenciation neuronale.

En me basant sur ces observations, je propose un réseau de régulation dans lequel Esg contrôle la dynamique d'expression de *pros* dans le neurone et la cellule gaine. A son tour, dans le neurone, Pros assure l'initiation de la détermination neuronale via la production de facteurs impliqués dans la différenciation neuronale comme *elav* et *nerfin-1*. A l'inverse dans la gaine Pros réprimerait l'identité neuronale en réprimant l'expression d'*elav* et *nerfin-1* (Fig.53). De plus, il est intéressant de noter que l'identification des cibles transcriptionnelle de Snail et Pros identifiées chez l'embryon (Southall et Brand, 2009 ; voir aussi [www.neuroblast.org](http://www.neuroblast.org)) est en accord avec ce réseau de régulation. En effet cette analyse montre d'une part que *pros* est une cible de Snail (et potentiellement d'Esg vu qu'ils possèdent le même site de fixation). D'autre part qu'*elav* et *nerfin-1* sont décrits comme des cibles de Pros (Southall et Brand, 2009). De plus, Esg pourrait participer à la différenciation neuronale autrement qu'en régulant l'expression de *pros*. En effet, Robo, Slit et Futsch (respectivement deux facteurs de la guidance axonale et une protéine du cytosquelette axonal) ont été identifiés comme des cibles transcriptionnelles de Snail (Southall et Brand, 2009). Il serait nécessaire d'analyser si ces facteurs participent à l'arborisation axonale dans les organes mécanosensoriels et si leur expression est régulée par Esg.

Toutefois dans ce modèle la place de miR-279 dans ce réseau de régulation est moins évidente. En effet les données de perte et de gain de fonction sont contradictoires. La perte de fonction *miR-279* provoque la production de neurones ectopiques indiquant un rôle de miR-279 comme répresseur de l'identité neuronale. A l'inverse sa surexpression transforme le précurseur pIIIb en neurone, suggérant que miR-279 peut promouvoir l'identité neuronale. Néanmoins comme je l'ai souligné dans les résultats, la transformation de pIIIb en neurone pourrait être due à une perte de la capacité proliférative de pIIIb suite à la présence ectopique de miR-279 plutôt qu'à un effet direct de miR-279 sur l'identité neuronale. Mais en absence du profil d'expression de ce miRNA, je ne peux pas conclure sur sa position dans le réseau de régulation contrôlant la détermination neuronale.



Pour résumer, bien que les organes mécanosensoriels et les organes sensibles au CO<sub>2</sub> expriment les mêmes facteurs, la manière dont ces facteurs interagissent pour promouvoir la détermination neuronale est très différente.

En conclusion de cette partie, bien que divers points nécessitent une analyse supplémentaire, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont contribué à mieux comprendre les mécanismes sous-tendant l'acquisition de l'identité cellulaire dans les organes mécanosensoriels de la drosophile. Mais, au delà du lignage des soies, ces travaux ont également une portée plus générale sur les mécanismes contrôlant la détermination cellulaire au cours du développement.





# **Discussion générale**



La compréhension des mécanismes contrôlant la mise en place de l'identité neurale et neuronale dans le lignage des soies mécanosensorielles a été un point central de mes travaux de thèse. Mes données conduisent néanmoins à s'interroger si les mécanismes et les réseaux de régulation qui ont été identifiés ont une pertinence au regard de la détermination cellulaire au cours du développement. En quoi Esg et Scrt contribuent-ils à la mise en place de l'identité neurale pIIb ? Comment la redondance entre Esg et Scrt est-elle possible ? Qu'implique-t-elle pour l'étude du développement et au niveau de l'évolution de la superfamille Snail ? Quelle est l'importance de l'interaction entre Esg, Scrt et la voie Notch pour l'acquisition de l'identité cellulaire ? Comment des facteurs peuvent-ils avoir des effets contradictoires sur le contrôle de l'identité cellulaire, générant ainsi des types cellulaires opposés ? Cette section sera consacrée à discuter de ces différents points.

## **I. Vers l'identification des déterminants cellulaires de l'identité pIIb**

Au cours de ces quatre années, l'objectif de mes recherches a été l'identification de facteurs impliqués dans la détermination cellulaire, plus particulièrement de l'identité neurale dans les organes mécanosensoriels de la drosophile. Mes données montrent que les facteurs de transcription Esg et Scrt, exprimés dans le sous-lignage neural des organes mécanosensoriels, participent au maintien de l'identité du précurseur neurale en empêchant une activation anormale de la voie Notch dans cette cellule. De plus Esg a un rôle supplémentaire dans la régulation de la progression de la détermination neuronale et de l'axonogenèse. Même si Esg et Scrt sont impliqués dans l'acquisition de l'identité neurale et neuronale, peut-on réellement les définir comme des déterminants cellulaires ? Comment s'inscrivent-ils dans le processus de détermination neuronale ?

### **1. (Re)Définition d'un déterminant cellulaire**

Classiquement, un déterminant cellulaire est défini comme un facteur qui induit une identité spécifique quand il est hérité par une cellule. Les facteurs codés par les gènes homéotiques sont des déterminants cellulaires au sens strict. La modification de l'expression de ces facteurs conduit à une substitution d'une région du corps par celle d'une autre région. Autrement dit ils sont nécessaires et suffisants à la mise en place d'une identité spécifique d'une population de cellules à l'origine des différents organes. Un exemple bien connu est le gène homéotique *antennapedia*. Une perte de fonction de ce gène provoque la conversion de la seconde paire de pattes en des antennes



ectopiques (Struhl, 1981). A l'inverse, sa surexpression dans la région céphalique conduit à la conversion des antennes en pattes. Mais cette définition de déterminants cellulaires est assez stricte et concerne peu de facteurs.

Ainsi une définition un peu plus large énonce qu'un déterminant cellulaire est un facteur qui régule le destin cellulaire. Un exemple est celui de la protéine Numb. Dans les organes mécanosensoriels, Numb est hérité de manière différentielle à chaque division. La perte de fonction *numb* induit la transformation du précurseur secondaire pIIb en pIIa (Rhyu et al., 1994). A l'inverse, une expression ectopique dans la cellule pIIa conduit cette cellule à adopter l'identité pIIb (Rhyu et al., 1994). Numb est donc nécessaire et suffisant pour l'acquisition de l'identité pIIb. Notamment, Numb empêche le recyclage de Notch vers la membrane plasmique, prévenant ainsi l'activation de la voie Notch dans la cellule pIIb et sa transformation en pIIa (Frise et al., 1996 ; Santolini et al., 2000 ; Couturier et al., 2013). Ceci indique d'une part que Numb ne contrôle pas directement l'acquisition de l'identité pIIb et d'autre part que celle-ci serait mise en place « par défaut », en absence d'activation de la voie Notch. Une autre caractéristique de Numb est que son action n'est pas restreinte aux précurseurs secondaires. En effet, lors de la perte de fonction *numb*, les deux cellules pIIa ne génèrent pas respectivement une soie et une cellule socle comme attendu. Elles donnent naissance à deux cellules socles, indiquant que Numb contrôle également l'identité des cellules filles de pIIa (Rhyu et al., 1994).

En se référant à la définition stricte d'un déterminant cellulaire, Numb ne cadre pas parfaitement. En effet, il n'induit pas l'acquisition d'une seule identité cellulaire spécifique et ne participe pas directement à la modification de l'expression des gènes inhérente à un changement d'identité mais il permet la mise en place d'une identité « par défaut ». Par contre, Numb est un régulateur du destin cellulaire, et donc bien un déterminant cellulaire, même si ce n'est pas au sens strict du terme.

Esg et Scrt rentrent-ils dans ces définitions de déterminants cellulaires ? Concernant Esg et l'identité neuronale, je pense qu'il est exclu qu'Esg soit un déterminant de l'identité neuronale. En effet sa perte de fonction ne provoque pas une absence de neurone mais juste un retard dans la progression de la détermination neuronale. D'après mes données, le facteur de transcription Pros correspondrait plus à la définition de déterminant. Sa perte de fonction aboutit à une absence de détermination du neurone mais également de la cellule gaine, suggérant que Pros



pourrait être un déterminant de l'identité neuronale mais également de l'identité gaine, bien que ces deux fonctions soit assez contradictoires (voir plus loin).

Concernant Esg, Scrt et l'identité neurale pIIb, la question est plus délicate. Plusieurs caractéristiques sont en accord avec la définition d'un déterminant cellulaire. En effet une modification de leur expression induit dans les précurseurs secondaires des phénotypes similaires à ceux observés avec Numb. La perte de fonction *esg* et *scrt* provoque une transformation de la cellule pIIb en pIIa. A l'inverse la surexpression d'un seul de ces facteurs dans la cellule pIIa provoque sa transformation en cellule pIIb. De plus, contrairement à Numb, l'effet de l'action conjointe d'Esg et Scrt est spécifique des précurseurs secondaires puisque je n'observe pas de modification de l'identité cellulaire dans les cellules filles de pIIa et pIIb.

Néanmoins, plusieurs points sont en contradictions avec les caractéristiques d'un déterminant cellulaire classique. En considérant le profil d'expression d'Esg et Scrt, ils ne sont pas présent au début de la vie de pIIb. Une analyse *in vivo* a montré qu'Esg apparait environ 30 minutes avant la division de pIIb, soit bien après que l'identité pIIb ait été spécifiée (l'identité pIIb est mise en place environ 10 minutes après la division de pI, Remaud et al., 2008). Ainsi Esg et Scrt participent au maintien de l'identité pIIb et pas à la spécification de son identité, allant à l'encontre de la définition du déterminant cellulaire. Finalement, un point important est qu'Esg et Scrt agissent de manière redondante pour réguler l'identité pIIb. Il faudrait donc les considérer comme des déterminants cellulaires ensemble et pas individuellement.

Ainsi la question qui se pose est : est-ce que des facteurs redondants intervenant dans le maintien d'une identité cellulaire peuvent être considérés comme des déterminants cellulaires ? *In fine*, la perte ou le gain de fonction *esg/scrt* aboutit à une modification de l'identité des précurseurs secondaires. Ce sont donc des régulateurs du destin cellulaire tout comme Numb. Je tendrais donc à considérer Esg et Scrt, agissant ensemble, comme des déterminants de l'identité pIIb au sens large du terme. J'ajouterais même que leur rôle de déterminant d'Esg et Scrt étant limité aux précurseurs secondaires, ils seraient même des déterminants cellulaires plus spécifiques que Numb dans les organes mécanosensoriels.

Ainsi Esg et Scrt définissent une nouvelle catégorie de déterminant cellulaire : des facteurs qui, en agissant ensemble, permettent le maintien de l'identité cellulaire. De





plus, cela inscrit la redondance comme un mécanisme supplémentaire de contrôle de l'identité cellulaire.

## 2. Acquisition de l'identité du précurseur secondaire pIIb

Ainsi *Esg* et *Scrt* sont des déterminants cellulaires. Néanmoins comment s'inscrivent-ils dans la machinerie contrôlant l'acquisition de l'identité pIIb ? Interagissent-ils avec *Numb*, un autre déterminant de l'identité pIIb ?

Concernant la relation entre *Numb*, *Esg* et *Scrt*, mes données montrent que la localisation asymétrique de *Numb* n'est pas altérée dans un contexte de perte de fonction *esg/scrt*. Or dans ce contexte, j'observe que la cellule pIIb est transformée en pIIa. Ceci indique que *Numb* n'est pas suffisant pour maintenir la non-activation de Notch tout au long de la vie de la cellule pIIb. Ainsi la mise en place de l'identité pIIb requiert une action coordonnée de ces trois facteurs : *Numb* agissant au début pour initier la non-activation de la voie Notch dans la future cellule pIIb puis plus tard *Esg* et *Scrt* prennent le relai pour maintenir cette non-activation. Néanmoins ce modèle sous-entend un point important : l'acquisition de l'identité pIIb serait mise en place « par défaut » dans un contexte de non-activation de Notch.

Or l'expression d'*esg* et *scrt* est tardive mais également spécifique de l'identité pIIb, indiquant qu'un facteur spécifique de pIIb a initié leur expression. De plus ce facteur agirait indépendamment de la division cellulaire. En effet, en contexte d'inhibition de la division de la cellule pI (et où la cellule pI est transformée en pIIb), *esg* et *scrt* commencent à s'exprimer lorsque celle-ci acquiert l'identité pIIb. Finalement, l'initiation de l'expression d'*esg* et *scrt* dans la cellule pIIb n'est pas dépendante d'une non-activation de Notch, puisque dans la cellule pI la voie Notch n'est pas activée et pourtant *esg* et *scrt* ne s'expriment pas. Tout ceci me conduit à envisager que la spécification de l'identité pIIb n'est pas un phénomène passif. Elle implique un ou des facteurs qui vont mettre en place l'identité pIIb et notamment activer l'expression d'*esg* et *scrt*.

Quel(s) facteur(s) ou quel mécanisme spécifie l'identité pIIb et active l'expression d'*esg* et *scrt* dans la cellule pIIb ? Plusieurs possibilités non exclusives s'offrent à nous quant à l'identité de ce facteur :

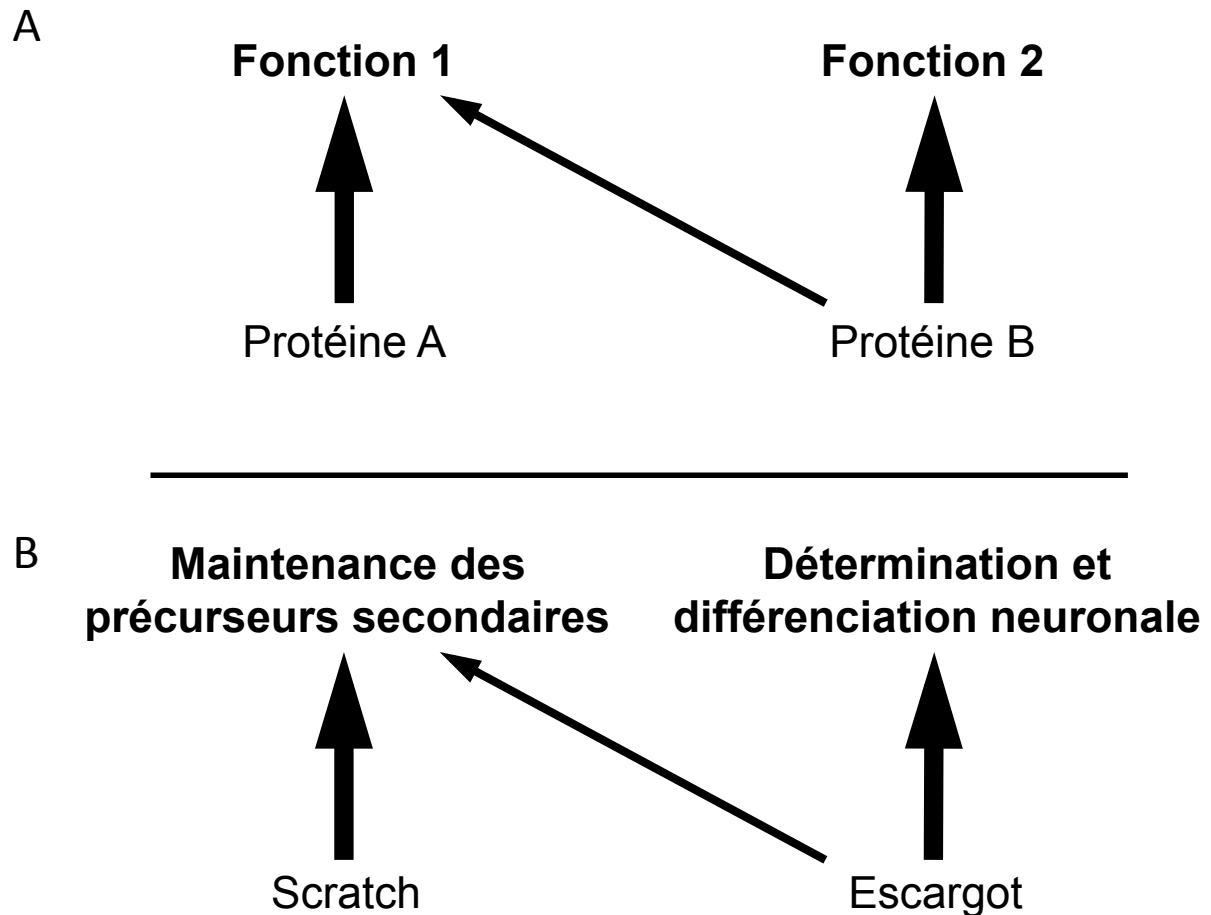
(i) L'expression d'*Esg* et *Scrt* serait contrôlée par un facteur temporel spécifiant l'identité pIIb. Les travaux de Pierre Fichelson montre que l'inhibition de la division de la cellule pI provoque la transformation de la cellule pI en pIIb (Fichelson et al., 2004). L'hypothèse concernant cette transformation est qu'un facteur de



transcription temporel contrôlant le passage vers l'identité pIIb serait produit ou dégradé au cours du temps. Ce facteur participerait à l'initiation de l'expression d'*esg* et *scrt*.

(ii) Un miRNA, impliqué dans l'inhibition de l'identité pIIb, réprimerait l'expression d'*esg* et *scrt*. Les miRNA régule temporellement l'expression des gènes et les changement d'identité associé tout au long du développement (Revue par Ambros, 2011). Un miRNA pourrait donc contrôler la progression de l'identité pIIb et l'expression d'*esg* et *scrt*. Ce miRNA serait présent dans la cellule pI et au début de la vie de pIIb. Sa disparition contribuerait à la spécification de l'identité pIIb et à la dé-répression de l'expression d'*esg* et *scrt*. Dans cette idée, j'ai cherché les miRNA connus pour cibler les ARNm d'*esg* et *scrt* (analyse faite par TargetScanFly). Or je n'ai pas identifié de miRNA commun régulant l'expression de ces deux gènes. Ceci indiquant soit que deux miRNA différents se coordonneraient pour réprimer l'expression d'*esg* et *scrt* au même moment, soit qu'*esg* et *scrt* sont régulés par un miRNA non décrit ou bien que les miRNA ne sont pas impliqués dans ce processus.

(iii) Le ligand Delta serait la source d'une signal promouvant l'expression d'*esg* et *scrt*. Dans le signal Eph-Ephrin, récepteurs et ligands sont respectivement la source d'un signal classique et inverse. Il serait donc possible d'imaginer que les ligands de Notch puissent être la source d'un signal inverse qui promouvrait l'identité pIIb. En effet, il a été montré dans des cellules neurales de souris en culture que la région intracellulaire de Delta est clivée puis transloquée dans le noyau où elle régule l'expression de gènes (Hiratochi et al., 2007). Ceci indique que le signal Notch pourrait être bi-directionnel chez les vertébrés. Chez la drosophile, Delta est également clivé mais selon un mécanisme différent de celui des vertébrés (Delwig et al., 2006) même si dans les deux cas le clivage de Delta serait favoriser par sa liaison avec Notch (Hiratochi et al., 2007 ; Delwig et al., 2006). Finalement, bien que chez la drosophile le clivage de Delta n'influence a priori pas l'identité cellulaire (Delwig et al., 2006), la surexpression du domaine intracellulaire de Delta dans des cellules souches neurales de souris promeut l'acquisition de l'identité neuronale, indiquant qu'un signal inverse, ayant pour origine Delta, pourrait être impliqué dans la détermination cellulaire. La recherche d'un tel mécanisme dans le lignage des soies serait intéressante.



**Figure 54 : Modélisation de la relation de redondance entre Esg et Scrt**

(A) Modélisation du maintien de la redondance entre deux protéines A et B de la même famille. Les protéines A et B sont issues d'un événement de duplication et ont divergé. La protéine A assure la fonction 1 et la protéine B la fonction 2. Néanmoins la protéine B assure toujours la fonction 1 mais avec une efficacité moindre que B. L'épaisseur des flèches représente l'efficacité des protéines à assurer une fonction. (B) Transposition du modèle à Esg et Scrt dans le lignage des soies mécanosensorielles.

En conclusion, l'identité pIIb résulterait de l'action séquentielle de multiples facteurs qui s'entrecroisent tout au long de la vie de pIIb : peu après la division de pI, Numb empêche l'activation de la voie Notch dans la cellule antérieure. Parallèlement, Un facteur promouvrait la spécification de l'identité pIIb et activerait l'expression d'*esg* et *scrt*. Finalement, Esg et Scrt, en agissant de manière redondante, assurent le maintien de cette identité avant la division de pIIb.

## **II. Redondance entre la famille Snail et la famille Scratch**

La redondance peut être définie comme la capacité de deux protéines proches à assurer la même fonction. Ainsi la présence d'un seul de ces facteurs est suffisante pour compenser la perte de fonction de l'autre. Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence qu'Esg et Scrt agissent de manière redondante pour le maintien de l'identité du précurseur secondaire pIIb. Seule la déplétion conjointe de ces facteurs provoque une modification de l'identité de cette cellule.

### **1. Redondance entre Escargot et Scratch dans le lignage des soies mécanosensorielles**

#### *(1) Modélisation de la relation de redondance entre Esg et Scrt*

La redondance entre protéines découle d'un événement de duplication produisant deux copies d'un même gène et donc deux protéines identiques. L'accumulation de mutations au fil des générations entraîne une divergence de ces deux protéines identiques, qui potentiellement acquièrent de nouvelles fonctions. Ainsi au cours du temps, l'homologie de séquences entre les deux gènes dupliqués diminuent et le chevauchement de fonction des protéines paralogues disparaît. Dans ce cas comment la redondance peut-elle être maintenue au cours de l'évolution?

Plusieurs hypothèses s'offre à nous mais je vais me concentrer sur une qui a retenue particulièrement mon attention par rapport à mes données (Cooke et al., 1997). Dans cette hypothèse, les deux gènes homologues A et B divergent et acquièrent chacun une fonction spécifique (1 et 2 respectivement). Néanmoins la protéine B garde toujours la capacité d'assurer la fonction 1 mais avec une efficacité moindre que la protéine A (Fig.54A). Ainsi les protéines A et B assurent toutes deux la même fonction et B assure une fonction indépendamment de A. Puisque la protéine B est moins efficace que A pour la fonction 1, la protéine A est maintenue. La fonction 2 étant assurée uniquement par la



protéine B, celle-ci est également maintenue. Néanmoins si une mutation provoque une perte de fonction du gène codant A, alors la protéine B compense cette déficience. Maintenant si on transpose ce modèle de redondance à mon analyse, alors j'identifierais Scrt et Esg aux protéines A et B respectivement (Fig.54B). Toutes deux assurent la maintenance de l'identité neurale dans le précurseur secondaire (fonction 1) mais Esg assure également une fonction spécifique lors de la détermination neuronale (fonction 2). Il est intéressant de noter que cette transposition implique : (i) d'une part que Scrt serait plus efficace qu'Esg pour maintenir l'identité pIIb. Si un allèle nul *esg* a été utilisé lors des analyses de perte de fonction, *scrt* a été étudié uniquement en contexte de diminution de dose (hétéroallélique ou RNAi). Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi la fréquence d'apparition des transformations de pIIb en pIIa lors de la perte de fonction *esg/scrt* est relativement faible (16%). (ii) d'autre part que la fonction ancestrale serait le maintien de l'identité précurseur via une interaction avec la voie Notch alors que la régulation de la progression de la détermination neuronale serait la fonction dérivée.

## (2) *Implication de ce modèle pour les organes mécanosensoriels*

La voie Notch étant activée entre les cellules filles à chaque division, l'effet redondant d'Esg et Scrt est-il généralisable au reste du lignage ? En effet, *esg* et *scrt* sont co-exprimés dans toutes les cellules du sous-lignage interne issu de pIIb. Ils pourraient contrôler le maintien de la non-activation de la voie Notch dans les cellules filles de pIIb. Pourtant lors d'une perte de fonction *esg* et *scrt*, dans les organes où la transformation de pIIb en pIIa n'est pas effective, je n'ai jamais observé de transformation du neurone en gaine, signe d'une activation anormale de la voie Notch dans le neurone. Ceci indique que ces facteurs ne sont pas impliqués dans la maintenance de l'activation différentielle de la voie Notch entre ces deux cellules. Comment l'action redondante d'Esg et Scrt est-elle limitée aux précurseurs secondaires ? De même, comment Esg passe-t-il d'une action redondante avec Scrt dans le précurseur secondaire à une autre fonction qui lui est propre lors de la détermination neuronale ?

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour répondre à ces questions :

(i) L'action redondante d'Esg et Scrt pourrait dépendre de co-facteurs qui ne seraient pas présents dans le neurone. En effet, Esg et Scrt n'interagissent pas avec les mêmes facteurs pour réprimer l'expression des gènes. Alors qu'Esg interagit avec CtBP ou Ebi, Scrt interagirait directement avec des histones déacétylases (Revue par Nieto et





al., 2002). Les partenaires de Scrt sont peut-être présents uniquement dans le précurseur pIIb, expliquant que l'action redondante soit restreinte à cette cellule. Alternativement il a été suggéré que l'action de Snail en tant que répresseur ou activateur de l'expression des gènes dépendrait des facteurs de transcription fixés à proximité (Rembold et al., 2014). Ainsi les co-facteurs favorisant la redondance d'Esg et Scrt pourraient être spécifiques de la cellule pIIb.

(ii) Esg et Scrt serait incapables d'interagir avec la voie Notch dans le neurone et la gaine. L'hypothèse de travail est qu'Esg et Scrt maintiennent la non-activation de Notch en réprimant l'expression des gènes cibles de la voie. Or une des possibilités pour expliquer cette interaction est qu'Esg et Scrt agissent sur la stabilité du complexe répresseur contenant Su(H). Or, entre le neurone et la gaine, le signal Notch s'effectue selon une voie non canonique indépendante de Su(H) (Nagel et al. 2000 ; Revue par Andersen et al., 2012). Dans ce cas Esg et Scrt ne seraient pas capables de modifier l'expression des gènes cibles de Notch dans ces cellules. Alternativement, les gènes cibles de la voie Notch changeants en fonction du type cellulaire, Esg et Scrt ne sont peut-être pas capables de réprimer l'expression des gènes cibles spécifiques du neurone et de la gaine.

Dans tous les cas, la transition d'une action redondante d'Esg et Scrt à une fonction propre à Esg semble être dépendante de l'identité cellulaire et des co-facteurs présents. Mon étude est la première observation qu'au sein d'un même lignage, des facteurs de la superfamille peuvent avoir d'une part une action redondante et d'autre part une action qui leur est propre. En effet ils sont considérés généralement comme ayant une action redondante ou individuelle, mais il y n'a pas à ma connaissance d'exemple montrant les deux dans le même lignage cellulaire.

## **2. Redondance entre Escargot et Scratch dans d'autres systèmes**

Des cas de redondance entre protéines de la famille Snail ont été observés à de multiples reprises. Tout d'abord chez la drosophile, les trois protéines Snail, Esg et Worniu agissent de manière redondante lors de la division asymétrique des neuroblastes (Ashraf et al., 1999 ; Ashraf et al., 2001 ; Cai et al., 2001). Chez la souris, Sna1 et Sna2 participent de manière redondante au développement du tissu cartilagineux (Murray et al., 2007) et Sna1 et Sna3 au développement du système immunitaire (revue par Pioli et al., 2014). De même, Scrt1 et Scrt2 ont des fonctions



chevauchantes lors de la formation du néocortex de la souris (Itoh et al., 2013). Mes travaux sont la première observation d'une redondance entre des protéines de la famille Snail et de la famille Scratch, indiquant que les deux familles, même évolutivement distantes, conservent de fortes similitudes. En effet, bien que distants au niveau de la région carboxyle, la région amine qui regroupe les domaines doigts de zinc permettant la fixation sur l'ADN, reste très conservée. Ainsi tous les membres de la superfamille Snail peuvent se fixer sur les mêmes séquences nucléotidiques et deux facteurs n'appartenant pas à la même famille peuvent donc réguler un même groupe de gènes. Mais la redondance entre membre de la famille Snail et membre de la famille Scratch est-elle spécifique des organes mécanosensoriels ou est-il possible d'envisager qu'elle s'applique à d'autres systèmes et d'autres espèces ?

Une redondance entre *Esg* et *Scrt* suppose que, comme dans les organes mécanosensoriels, ces deux facteurs soient exprimés dans les mêmes cellules en même temps. Mes expériences montrent que c'est le cas dans les organes chordotonaux du système nerveux périphérique de l'embryon. De plus, *Esg* est impliqué dans l'arborisation des axones du système nerveux périphérique des embryons et plus particulièrement des organes chordotonaux. Néanmoins, lors d'une double perte de fonction *esg/scrt*, je n'ai pas détecté de modifications de l'identité neurale. En effet le nombre et la position des neurones des organes chordotonaux sont similaires à celle d'un embryon non mutant. Ces résultats suggèrent que, pour ces organes bien que la fonction d'*Esg* dans le contrôle de la détermination neuronale soit conservée, celle d'*Esg* et *Scrt* dans le maintien de l'identité neurale ne l'est pas. Toutefois *esg* et *scrt* ont des profils d'expression similaires dans d'autres systèmes, notamment dans les neuroblastes larvaires et lors de la formation du disque d'œil (Roark et al., 1995 ; Hughes et Thomas, 2007 et observations personnelles). *Esg* et *Scrt* pourraient donc avoir une fonction redondante dans d'autres cellules neurales au cours du développement de la drosophile.

Au delà de la drosophile, la redondance entre membres de la famille Snail et de la famille Scratch pourrait également jouer un rôle dans le développement des eucaryotes supérieur. Lors du développement du néocortex de la souris, Snail et les facteurs Scratch1/2 sont co-exprimés dans les progéniteurs neuraux de la zone ventriculaire (Zander et al., 2014 ; Paul et al., 2012 ; Itoh et al., 2013). Alors que Snail régule la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires de ces progéniteurs neuraux, les protéines Scratch1/2 permettent la transition entre l'identité de progéniteur neuronal



intermédiaire et celle de neurone en cours de migration. Une action commune de ces facteurs (respectivement orthologues d'Esg et Scrt) lors du développement du néocortex de la souris est envisageable.

Pour résumer, lors du développement des cellules neurales chez la drosophile et les Vertébrés, Esg et Scrt ou leur orthologues sont exprimés en même temps dans une même population de cellules neurales, indiquant que la redondance entre ces facteurs est possible dans d'autres tissus.

### **III. Génération de la diversité cellulaire au cours du développement**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la diversité cellulaire repose sur de nombreux mécanismes de détermination qui s'entrecroisent tout au long du développement. Mes données ont montré qu'Esg et Scrt contribuent à l'établissement de la diversité cellulaire dans le lignage des soies. Mais en quoi contribuent-elles à la compréhension générale des mécanismes de détermination cellulaire au cours du développement ?

#### **1. Maintien de l'activation différentielle de la voie Notch au cours du développement : un niveau de régulation supplémentaire**

L'activation différentielle de la voie Notch intervient dans de nombreux types cellulaires au cours du développement et permet la mise en place d'identités cellulaires distinctes entre cellules adjacentes. L'initiation de cette activation différentielle repose sur une expression différentielle de facteurs de transcription (comme lors de la formation de la frontière dorso-ventrale), sur une variation stochastique de la production de ligands et de récepteurs (comme lors de l'inhibition latérale) ou bien sur la ségrégation asymétrique de facteurs qui interviennent dans le trafic intracellulaire du ligand et du récepteur tels que Neuralized, Numb ou Sanpodo (comme dans les organes mécanosensoriels). Mais, une fois l'activation différentielle de la voie Notch établie, comment est-elle maintenue au cours du temps ?

Un mécanisme de maintien de l'activation différentielle de la voie Notch est la cis-inhibition (revue par Del Alamo et al., 2011). Ligand et récepteur se côtoient à la surface de la cellule émettrice et de la cellule réceptrice. Seul le ratio ligand/récepteur change entre les deux types de cellules. La cis-inhibition assure, via une interaction directe



entre ligands et récepteurs d'une même cellule, que la voie Notch ne soit pas activée dans la cellule émettrice du signal. Dans la cellule émettrice, le ligand interagit avec le récepteur, provoquant son endocytose, sa dégradation et empêchant ainsi une activation ectopique du signal dans cette cellule. Réciproquement, dans la cellule réceptrice, le récepteur interagit avec le ligand, provoquant son élimination de la membrane plasmique et empêchant son interaction avec les récepteurs des cellules voisines. Ainsi, par un jeu d'exclusion réciproque de la membrane plasmique, les ligands, les récepteurs et le trafic intracellulaire participent au maintien de l'activation différentielle de la voie Notch et empêchent une activation anormale.

Mes travaux de thèse suggèrent qu'un autre mécanisme de maintien de l'activation différentielle de la voie Notch existe. Dans les organes mécanosensoriels, l'activation différentielle de la voie Notch est assurée par la répartition asymétrique des facteurs contrôlant l'activité de la voie. Néanmoins ce mécanisme ne permet pas son maintien au cours du temps. En effet, bien que la ségrégation asymétrique de Numb et Pon ne soient pas altérées lors d'une double perte de fonction *esg* et *scrt*, les cellules émettrices pIIb acquièrent l'identité pIIa, indiquant que la voie Notch a été activée de manière ectopique dans ces cellules. Ainsi un niveau supplémentaire du maintien de l'activation différentielle de la voie Notch existe. Il passe par Esg et Scrt qui assurent le « verrouillage » de la non-activation de Notch dans la cellule émettrice. Ces facteurs réduisent la compétence des cellules à répondre à toute activité résiduelle de la voie Notch.

Par ailleurs, il serait d'ailleurs intéressant de comprendre d'où provient cette activité résiduelle de la voie Notch. Le facteur Numb, présent tout au long de la vie de pIIb, régule l'endocytose du récepteur Notch et empêche son recyclage vers la membrane plasmique (Frise et al., 1996 ; Santolini et al., 2000 ; Couturier et al., 2013). Or les récepteurs Notch présents dans les vésicules intracellulaires peuvent être clivés et ainsi activer ectopiquement la voie (Vaccari et al., 2008). Ainsi il est possible d'envisager que le mécanisme initiant l'activation différentielle de la voie Notch via le trafic intracellulaire du récepteur soit la cause de l'activité résiduelle. Une autre possibilité serait l'existence de fluctuations intrinsèques de l'activité de la voie Notch, une sorte de « bruit de fond » cellulaire conduisant à l'activation de la voie (Balázs et al., 2011).





En résumé, mes résultats ébauchent un nouveau mécanisme de maintien de l'activation différentielle de la voie Notch au cours du développement, nécessitant l'intervention d'autres facteurs qui vont contrecarrer une fluctuation résiduelle de l'activité de la voie Notch. Il serait intéressant d'étudier ce phénomène dans d'autres lignages cellulaires où divisions asymétriques et activation différentielle de la voie Notch s'entrecroisent (comme le lignage intestinal, nerveux, des photorécepteurs et musculaire). Cela permettrait de déterminer si ce nouveau mécanisme de maintien de l'activation différentielle, et donc de l'identité cellulaire, est utilisé dans différents systèmes au cours du développement.

## **2. Ambivalence des facteurs régulant la détermination de l'identité cellulaire : exemple du neurone et de la cellule gaine**

La détermination cellulaire implique, en fonction de l'identité engagée, la régulation spécifique de l'expression de gènes participant à la différenciation. Cette expression est majoritairement contrôlée par des facteurs de transcription. Pour chaque identité cellulaire, il devrait donc être possible de définir un « code moléculaire » comprenant tous les facteurs de transcription exprimés dans cette cellule et qui participent à l'acquisition de son identité. Toutefois un même facteur, retrouvé dans différents types cellulaires, peut avoir des effets contradictoires.

Par exemple le facteur de transcription OCT4 est impliqué d'une part dans le maintien de la pluripotence des cellules embryonnaires et d'autre part dans leur différenciation en cellule du trophoctoderme ou du mésoderme (Niwa et al., 2000). Ces différences dépendraient du niveau d'expression d'*oct4* dans les cellules. Ceci n'est pas sans rappeler mes observations montrant qu'une augmentation de la dose d'Esg dans les organes mécanosensoriels induit une augmentation du nombre de divisions et une mort cellulaire accrue, probablement via la régulation de l'expression de cibles non-spécifiques. Ainsi les facteurs régulant l'identité cellulaire ont une action dose-dépendante et le contrôle de leur niveau d'expression est essentiel pour l'acquisition de l'identité cellulaire.

La détermination du neurone et de la cellule gaine des organes mécanosensoriels est une parfaite illustration des systèmes cellulaires où des facteurs peuvent avoir un effet contradictoire. Mes données montrent qu'Esg régule la progression de la détermination neuronale via le contrôle de la dynamique d'expression de *pros*, codant un effecteur clé de la détermination neuronale. Néanmoins Esg et Pros sont également



présent dans la gaine, cellule sœur du neurone, où ils contrôlent la mise en place de son identité. Comment deux facteurs, présents dans deux cellules sœurs, peuvent-ils aboutir à la formation de deux cellules d'identité différente ?

Dans ce contexte, même si un effet dose ne peut être complètement exclu, d'autres alternatives non exclusives permettraient d'expliquer ce phénomène :

(i) Des co-facteurs spécifiques de chaque identité modulerait l'action d'Esg et Pros, leur conférant des capacités distinctes dans le neurone et dans la cellule gaine. Sachant que Snail peut aussi bien être activateur que répresseur de l'expression des gènes en fonction des facteurs présents à proximité de son site de fixation (Rembold et al., 2014), il est possible d'envisager qu'Esg réprime ou active l'expression de *pros* en fonction du contexte cellulaire. Pour Pros un mécanisme similaire pourrait être envisagé.

(ii) L'activation différentielle de la voie Notch entre le neurone et la gaine entrainerait une variation dans les fonctions d'Esg et Pros. Dans le neurone, en absence d'activation de la voie Notch, Esg et Pros promouvrait l'identité neuronale. A l'inverse, l'activation de Notch dans la cellule gaine induirait la conversion d'Esg et Pros en inhibiteurs de l'identité neuronale et en activateurs de l'identité gaine. Par ailleurs, la voie Notch pourrait être à l'origine de la production différentielle des co-facteurs d'Esg et Pros énoncée plus haut.

(iii) L'organisation du génome pourrait être différente entre le neurone et la gaine. En effet il a été montré que la compétence des neuroblastes à produire certains types cellulaires diminue avec le temps. Cette diminution dépendrait d'une réorganisation du génome qui repositionnerait un ou des gènes dont l'expression est requise pour l'acquisition de ces identités dans une zone où la transcription est inhibée (Kohwi et al., 2013). Ainsi, en fonction du type cellulaire, Esg et Pros pourraient ne pas avoir accès aux mêmes gènes cibles.

En résumé, la détermination du neurone et de la gaine implique des facteurs communs qui vont avoir des effets ambivalents. Il est toutefois important de noter que l'ambivalence de ces facteurs, plus particulièrement celle de Pros, n'est pas limitée aux organes mécanosensoriels.

En effet, tout au long du développement de la drosophile, Pros a un rôle récurrent dans la régulation des capacités prolifératives et dans la mise en place de l'identité



neuronale. Dans les neuroblastes embryonnaires, l'entrée de Pros dans le noyau est suffisante pour induire la sortie du cycle cellulaire et la mise en place de l'identité GMC (Shen et al., 1997). De plus, dans les neuroblastes larvaires, Pros est présent de manière transitoire au début de la vie des neurones nouvellement formés et comme dans les organes mécanosensoriels, ce pic d'expression est essentiel à la détermination et à la différenciation neuronale (Colonques et al., 2011). A l'inverse, dans les organes sensibles au CO<sub>2</sub>, Pros est exprimé uniquement dans la cellule gaine et inhibe la mise en place de l'identité neuronale dans cette cellule (Hartl et al., 2011). De même son orthologue Prox1 a également des effets ambivalents lors du développement des mammifères (neurogenèse du cortex, développement du foie, du cœur et du pancréas).

Concernant Esg, jusqu'à présent il n'a pas été décrit comme ayant un rôle ambivalent dans d'autre système. Au contraire, il semble fréquemment requis pour l'acquisition de l'identité neuronale et cette fonction semble conservée au cours de l'évolution (Hartl et al., 2011 ; Yang et al., 2010). Néanmoins, un effet opposé à celui observé dans les organes sensoriels a été observé mais il implique un autre membre de la famille Snail : Wornui. Dans les neuroblastes larvaires, Wor inhibe la différenciation neuronale notamment en réprimant l'expression d'*elav*. Esg et Wornui étant proches au point d'agir de manière redondante dans les neuroblastes embryonnaires, cela pourrait être considéré comme un autre exemple d'ambivalence mais qui implique cette fois une famille de protéine.

L'étude de la détermination neuronale dans les organes mécanosensoriels a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives sur des mécanismes plus généraux de contrôle de l'identité cellulaire. Mais je pense que ce qui ressort de ces données est que la complexité des interactions entre les facteurs de détermination ainsi que l'influence de l'environnement cellulaire rendent très difficile la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la diversité cellulaire. L'analyse de systèmes cellulaires simples, tel que le lignage aboutissant à la formation des soies, continuera d'apporter une nouvelle vision des mécanismes de détermination cellulaire.



# **Bibliographie**





Agnès F, Suzanne M, Noselli S. The Drosophila JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development*. 1999, vol.126, p.5453-62.

Ambros V. MicroRNAs and developmental timing. *Curr Opin Genet Dev*. 2011, vol.21, p.511-7.

Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol*. 2012, vol.22, p.257-65.

Ashraf SI, Hu X, Roote J, Ip YT. The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control Drosophila neurogenesis. *EMBO J*. 1999, vol.18, p.6426-38.

Ashraf SI, Ip YT. The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in Drosophila. *Development*. 2001, vol.128, p.4757-67.

Ashraf SI, Ganguly A, Roote J, Ip YT. Worniu, a Snail family zinc-finger protein, is required for brain development in Drosophila. *Dev Dyn*. 2004, vol.231, p.379-86.

Atwood SX, Prehoda KE. aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol*. 2009, vol.19, p.723-9.

Bailey AM, Posakony JW. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev*. 1995, vol.9, p.2609-22.

Balázsi G, van Oudenaarden A, Collins JJ. Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals. *Cell*. 2011, vol.144, p.910-25.

Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000, vol.2, p.84-9.

Barolo S, Stone T, Bang AG, Posakony JW. Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev*. 2002, vol.16, p.1964-76.

Bellaïche Y, Radovic A, Woods DF, Hough CD, Parmentier ML, O'Kane CJ, Bryant PJ, Schweisguth F. The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in Drosophila. *Cell*. 2001, vol.106, p.355-66.

Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. Asymmetric segregation of the tumor suppressor *brat* regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells. *Cell*. 2006, vol.124, p.1241-53.

Blair SS, Brower DL, Thomas JB, Zavortink M. The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of Drosophila. *Development*. 1994, vol.120, p.1805-15.



Blair SS, Ralston A. Smoothed-mediated Hedgehog signalling is required for the maintenance of the anterior-posterior lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development*. 1997, vol.124, p.4053-63.

Bothma JP, Magliocco J, Levine M. The snail repressor inhibits release, not elongation, of paused Pol II in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*. 2011, vol.21, p.1571-7.

Bowman SK, Rolland V, Betschinger J, Kinsey KA, Emery G, Knoblich JA. The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2008, vol.14, p.535-46.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993, vol.118, p.401-15.

Bray S, Bernard F. Notch targets and their regulation. *Curr Top Dev Biol*. 2010, vol.92, p.253-75.

Brochtrup A, Hummel T. Olfactory map formation in the *Drosophila* brain: genetic specificity and neuronal variability. *Curr Opin Neurobiol*. 2011, vol.21, p.85-92.

Brody T, Odenwald WF. Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Dev Biol*. 2000, vol.226, p.34-44.

Brückner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science*. 1997, vol.275, p.1640-3.

Brückner K, Perez L, Clausen H, Cohen S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*. 2000, vol.406, p.411-5.

Cai Y, Chia W, Yang X. A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J*. 2001, vol.20, p.1704-14.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000, vol.2, p.76-83.

Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol*. 2001, vol.21, p.8184-8.

Casal J, Leptin M. Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, vol.93, p.10327-32.

Castro B, Barolo S, Bailey AM, Posakony JW. Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless. *Development*. 2005, vol.132, p.3333-44.



- Cave JW, Loh F, Surpris JW, Xia L, Caudy MA. A DNA transcription code for cell-specific gene activation by notch signaling. *Curr Biol.* 2005, vol.15, p.94-104.
- Chopra VS, Kong N, Levine M. Transcriptional repression via antilooping in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012, vol.109, p.9460-4.
- Colonques J, Ceron J, Reichert H, Tejedor FJ. A transient expression of Prospero promotes cell cycle exit of *Drosophila* postembryonic neurons through the regulation of Dacapo. *PLoS One.* 2011, vol.6, p.19342.
- Cooke J, Nowak MA, Boerlijst M, Maynard-Smith J. Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet.* 1997, vol.13, p.360-4.
- Cotton M, Benhra N, Le Borgne R. Numb inhibits the recycling of Sanpodo in *Drosophila* sensory organ precursor. *Curr Biol.* 2013, vol.23, p.581-7.
- Couturier L, Mazouni K, Schweisguth F. Numb localizes at endosomes and controls the endosomal sorting of notch after asymmetric division in *Drosophila*. *Curr Biol.* 2013, vol.23, p.588-93.
- Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, Robbins SM. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev.* 1999, vol.13, p.3125-35.
- de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ. Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development.* 1996, vol.122, p.359-69.
- de Celis JF, de Celis J, Ligoxygakis P, Preiss A, Delidakis C, Bray S. Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development.* 1996b, vol.122, p.2719-28.
- Dahmann C, Basler K. Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet.* 1999, vol.15, p.320-6.
- Deblandre GA, Lai EC, Kintner C. Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev Cell.* 2001, vol.1, p.795-806.
- del Álamo D, Rouault H, Schweisguth F. Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. *Curr Biol.* 2011, vol.21, p.40-7.
- Delwig A, Bland C, Beem-Miller M, Kimberly P, Rand MD. Endocytosis-independent mechanisms of Delta ligand proteolysis. *Exp Cell Res.* 2006, vol.312, p.1345-60.
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell.* 1993, vol.75, p.741-52.



Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development*. 1995, vol.121, p.4215-25.

Doherty D, Feger G, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev*. 1996, vol.10, p.421-34.

Edgar BA, Sprenger F, Duronio RJ, Leopold P, O'Farrell PH. Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev*. 1994, vol.8, p.440-52.

Emery G, Hutterer A, Berdnik D, Mayer B, Wirtz-Peitz F, Gaitan MG, Knoblich JA. Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell*. 2005, vol.122, p.763-73.

Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Aviño FJ, Dominguez M. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature*. 2006, vol.439, p.430-6.

Fichelson P, Gho M. The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of *Drosophila*. *Development*. 2003, vol.130, p.123-33.

Fichelson P, Gho M. Mother-daughter precursor cell fate transformation after Cdc2 down-regulation in the *Drosophila* bristle lineage. *Dev Biol*. 2004, vol.276, p.367-77.

Friedmann DR, Kovall RA. Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. *Protein Sci*. 2010, vol.19, p.34-46.

Fortini ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, vol.3, p.673-84.

Frise E, Knoblich JA, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, vol.93, p.11925-32.

Fristrom D, Wilcox M, Fristrom J. The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development*. 1993, vol.117, p.509-23.

Furriols M, Bray S. A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol*. 2001, vol.11, p.60-4.

Fuse N, Hirose S, Hayashi S. Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev*. 1994, vol.8, p.2270-81.

Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Amele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A, Vanderhaeghen P. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature*. 2008, vol.455, p.351-7.





Gho M, Schweisguth F. Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature*. 1998, vol.393, p.178-81.

Gho M, Bellaïche Y, Schweisguth F. Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development*. 1999, vol.126, p.3573-84.

Gordon WR, Vardar-Ulu D, L'Heureux S, Ashworth T, Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, McArthur DG, Histen G, Mitchell JL, Aster JC, Blacklow SC. Effects of S1 cleavage on the structure, surface export, and signaling activity of human Notch1 and Notch2. *PLoS One*. 2009, vol.4, e6613.

Grau Y, Carteret C, Simpson P. Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA* MELANOGASTER. *Genetics*. 1984, vol.108, p.347-60.

Gray S, Levine M. Transcriptional repression in development. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; vol.8, p.358-64.

Grosskortenhaus R, Pearson BJ, Marusich A, Doe CQ. Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell*. 2005, vol.8, p.193-202.

Grosshans J, Wieschaus E. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell*. 2000, vol.101, p.523-31.

Guillén I, Mullor JL, Capdevila J, Sánchez-Herrero E, Morata G, Guerrero I. The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development*. 1995, vol.121, p.3447-56.

Guo M, Jan LY, Jan YN. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron*. 1996, vol.17, p.27-41.

Haenfler JM, Kuang C, Lee CY. Cortical aPKC kinase activity distinguishes neural stem cells from progenitor cells by ensuring asymmetric segregation of Numb. *Dev Biol*. 2012, vol.365, p.219-28.

Hartl M, Loschek LF, Stephan D, Siju KP, Knappmeyer C, Kadow IC. A new Prospero and microRNA-279 pathway restricts CO2 receptor neuron formation. *J Neurosci*. 2011, vol.31, p.15660-73.

Hayashi S. A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development*. 1996, vol.122, p.1051-8.

Heitzler P, Simpson P. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell*. 1991, vol.64, p.1083-92.

Heitzler P, Bourouis M, Ruel L, Carteret C, Simpson P. Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development*. 1996, vol.122, p.161-71.



Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT. Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*. 2000, vol.257, p.1-12.

Hemavathy K, Hu X, Ashraf SI, Small SJ, Ip YT. The repressor function of Snail is required for *Drosophila* gastrulation and is not replaceable by Escargot or Worniu. *Dev Biol*. 2004, vol.269, p.411-20.

Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*. 1996, vol.86, p.35-46.

Hiratochi M, Nagase H, Kuramochi Y, Koh CS, Ohkawara T, Nakayama K. The Delta intracellular domain mediates TGF-beta/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway. *Nucleic Acids Res*. 2007, vol.35, p.912-22.

Hong W, Zhu H, Potter CJ, Barsh G, Kurusu M, Zinn K, Luo L. Leucine-rich repeat transmembrane proteins instruct discrete dendrite targeting in an olfactory map. *Nat Neurosci*. 2009, vol.12, p.1542-50.

Hong W, Mosca TJ, Luo L. Teneurins instruct synaptic partner matching in an olfactory map. *Nature*. 2012, vol.484, p.201-7.

Hughes CL, Thomas JB. A sensory feedback circuit coordinates muscle activity in *Drosophila*. *Mol Cell Neurosci*. 2007, vol.35, p.383-96.

Ingham PW, Fietz MJ. Quantitative effects of hedgehog and decapentaplegic activity on the patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol*. 1995, vol.5, p.432-40.

Ip YT, Park RE, Kosman D, Bier E, Levine M. The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 1992, vol.6, p.1728-39.

Ip YT, Maggert K, Levine M. Uncoupling gastrulation and mesoderm differentiation in the *Drosophila* embryo. *EMBO J*. 1994, vol.13, p.5826-34.

Isshiki T, Pearson B, Holbrook S, Doe CQ. *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell*. 2001, vol.106, p.511-21.

Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell*. 2003, vol.4, p.67-82.

Itoh Y, Moriyama Y, Hasegawa T, Endo TA, Toyoda T, Gotoh Y. Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nat Neurosci*. 2013, vol.16, p.416-25.



Izumi Y, Ohta N, Hisata K, Raabe T, Matsuzaki F. Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol.* 2006, vol.8, p.586-93.

Jacob L, Lum L. Hedgehog signaling pathway in Drosophila. *Sci STKE.* 2007, vol.2007, cm7.

Jafar-Nejad H, Andrews HK, Acar M, Bayat V, Wirtz-Peitz F, Mehta SQ, Knoblich JA, Bellen HJ. Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of Drosophila sensory organ precursors. *Dev Cell.* 2005, vol.9, p.351-63.

Jhaveri D, Saharan S, Sen A, Rodrigues V. Positioning sensory terminals in the olfactory lobe of Drosophila by Robo signaling. *Development.* 2004, vol.131, p.1903-12.

Jiménez F, Campos-Ortega JA. Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron.* 1990, vol.5, p.81-9.

Kasai Y, Nambu JR, Lieberman PM, Crews ST. Dorsal-ventral patterning in Drosophila: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, vol.89, p.3414-8.

Kataoka H, Murayama T, Yokode M, Mori S, Sano H, Ozaki H, Yokota Y, Nishikawa S, Kita T. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol.28, p.626-33.

Kidd S, Lieber T. Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function. *Mech Dev.* 2002, vol.115, p.41-51.

Kim HS, Jeong H, Lim SO, Jung G. Snail inhibits Notch1 intracellular domain mediated transcriptional activation via competing with MAML1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, vol.433, p.6-10.

Klein T. Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev.* 2001, vol.11, p.470-5.

Klein R, Kania A. Ephrin signalling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2014, vol.27, p.16-24.

Klueg KM, Parody TR, Muskavitch MA. Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during Drosophila development. *Mol Biol Cell.* 1998, vol.9, p.1709-23.

Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001, vol.2, p.11-20.

Kohwi M, Lupton JR, Lai SL, Miller MR, Doe CQ. Developmentally regulated subnuclear genome reorganization restricts neural progenitor competence in Drosophila. *Cell.* 2013, vol.152, p.97-108.



Kölsch V, Seher T, Fernandez-Ballester GJ, Serrano L, Leptin M. Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science*. 2007, vol.315, p.384-6.

Komiyama T, Carlson JR, Luo L. Olfactory receptor neuron axon targeting: intrinsic transcriptional control and hierarchical interactions. *Nat Neurosci*. 2004, vol.7, p.819-25.

Komiyama T, Sweeney LB, Schuldiner O, Garcia KC, Luo L. Graded expression of semaphorin-1a cell-autonomously directs dendritic targeting of olfactory projection neurons. *Cell*. 2007 jan, vol.128, p.399-410.

Komiyama T, Luo L. Intrinsic control of precise dendritic targeting by an ensemble of transcription factors. *Curr Biol*. 2007 Feb, vol.17, p.278-85.

Kooh PJ, Fehon RG, Muskavitch MA. Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development*. 1993, vol.117, p.493-507.

Kosman D, Ip YT, Levine M, Arora K. Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science*. 1991, vol.254, p.118-22.

Kramatschek B, Campos-Ortega JA. Neuroectodermal transcription of the *Drosophila* neurogenic genes *E(spl)* and *HLH-m5* is regulated by proneural genes. *Development*. 1994, vol.120, p.815-26.

Kraut R, Chia W, Jan LY, Jan YN, Knoblich JA. Role of *inscuteable* in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature*. 1996, vol.383, p.50-5.

Krejčí A, Bray S. Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev*. 2007, vol.21, p.1322-7.

Krejčí A, Bernard F, Housden BE, Collins S, Bray SJ. Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Sci Signal*. 2009, vol.2, ra1.

Kunisch M, Haenlin M, Campos-Ortega JA. Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *delta* is enhanced by proneural proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, vol.91, p.10139-43.

Kuzin A, Brody T, Moore AW, Odenwald WF. *Nerfin-1* is required for early axon guidance decisions in the developing *Drosophila* CNS. *Dev Biol*. 2005, vol.277, p.347-65.

LaBonne C, Bronner-Fraser M. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol*. 2000, vol.221, p.195-205.

Lai EC, Deblandre GA, Kintner C, Rubin GM. *Drosophila* *neuralized* is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of *delta*. *Dev Cell*. 2001, vol.1, p.783-94.





Lai EC, Roegiers F, Qin X, Jan YN, Rubin GM. The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development*. 2005, vol.132, p.2319-32.

Lai SL, Miller MR, Robinson KJ, Doe CQ. The Snail family member Worniu is continuously required in neuroblasts to prevent Elav-induced premature differentiation. *Dev Cell*. 2012, vol.23, p.849-57.

Le Borgne R, Bellaïche Y, Schweisguth F. *Drosophila* E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol*. 2002, vol.12, p.95-104.

Le Borgne R, Schweisguth F. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell*. 2003, vol.5, p.139-48.

Lecourtois M, Schweisguth F. The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev*. 1995, vol.9, p.2598-608.

Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP, Doe CQ. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell*. 2006, vol.10, p.441-9.

Leptin M, Grunewald B. Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development*. 1990, vol.110, p.73-84.

Leptin M, Roth S. Autonomy and non-autonomy in *Drosophila* mesoderm determination and morphogenesis. *Development*. 1994, vol.120, p.853-9.

Leptin M. Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms. *EMBO J*. 1999, vol.18, p.3187-92.

Lilly B, Galewsky S, Firulli AB, Schulz RA, Olson EN. D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, vol.91, p.5662-6.

Lim SO, Kim HS, Quan X, Ahn SM, Kim H, Hsieh D, Seong JK, Jung G. Notch1 binds and induces degradation of Snail in hepatocellular carcinoma. *BMC Biol*. 2011, vol.9, p.83.

Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, vol. 95, p.8108-12.

Maeder ML, Polansky BJ, Robson BE, Eastman DA. Phylogenetic footprinting analysis in the upstream regulatory regions of the *Drosophila* enhancer of split genes. *Genetics*. 2007, vol.177, p.1377-94.



- Maier D, Kurth P, Schulz A, Russell A, Yuan Z, Gruber K, Kovall RA, Preiss A. Structural and functional analysis of the repressor complex in the Notch signaling pathway of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*. 2011, vol.22, p.3242-52.
- Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*. 2001, vol.17, p.178-81.
- Martinez AM, Schuettengruber B, Sakr S, Janic A, Gonzalez C, Cavalli G. Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat Genet*. 2009, vol.41, p.1076-82.
- Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res*. 1993, vol.21, p.3951-7.
- Maurange C. Temporal specification of neural stem cells: insights from *Drosophila* neuroblasts. *Curr Top Dev Biol*. 2012. Vol.98, p.199-228.
- Metzstein MM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Mol Cell*. 1999, vol.4, p.309-19.
- Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS. The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development*. 1997, vol.124, p.1485-95.
- Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*. 2006, vol.439, p.475-9.
- Milán M, Cohen SM. Notch signaling is not sufficient to define the affinity boundary between dorsal and ventral compartments. *Mol Cell*. 1999, vol.4, p.1073-8.
- Morel V, Schweisguth F. Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 2000, vol.14, p.377-88.
- Morel V, Le Borgne R, Schweisguth F. Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression. *Dev Genes Evol*. 2003, vol.213, p.65-72.
- Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*. 2000, vol.5, p.197-206.
- Murray SA, Gridley T. Snail1 gene function during early embryo patterning in mice. *Cell Cycle*. 2006, vol.5, p.2566-70.
- Murray SA, Oram KF, Gridley T. Multiple functions of Snail family genes during palate development in mice. *Development*. 2007, vol.134, p.1789-97.
- Nagel AC, Maier D, Preiss A. Su(H)-independent activity of hairless during mechanosensory organ formation in *Drosophila*. *Mech Dev*. 2000, vol.94, p.3-12.



Nakayama H, Scott IC, Cross JC. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol.* 1998, vol.199, p.150-63.

Nibu Y, Zhang H, Levine M. Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science.* 1998, vol.280, p.101-4.

Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol.* 2008, vol.182, p.315-25.

Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science.* 1994, vol.264, p.835-9.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, vol.3, p.155-66.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000, vol.24, p.372-6.

O'Connor-Giles KM, Skeath JB. Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2003, vol.5, p.231-43.

Oda H, Tsukita S, Takeichi M. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol.* 1998, vol.203, p.435-50.

Ohlstein B, Spradling A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science.* 2007, vol.315, p.988-92.

Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature.* 1997, vol.387, p.908-12.

Parks AL, Klueg KM, Stout JR, Muskavitch MA. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development.* 2000, vol.127, p.1373-85.

Pastor-Pareja JC, Grawe F, Martín-Blanco E, García-Bellido A. Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell.* 2004, vol.7, p.387-99.

Paul V, Tonchev AB, Henningfeld KA, Pavlakis E, Rust B, Pieler T, Stoykova A. Scratch2 modulates neurogenesis and cell migration through antagonism of bHLH proteins in the developing neocortex. *Cereb Cortex.* 2014, vol.24, p.754-72.

Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol.* 2004, vol.24, p.306-19.



Perdigoto CN, Schweisguth F, Bardin AJ. Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development*. 2011, vol.138, p.4585-95.

Pioli PD, Weis JH. Snail transcription factors in hematopoietic cell development: A model of functional redundancy. *Exp Hematol*. 2014, vol.42, p.425-430.

Pitsouli C, Perrimon N. Embryonic multipotent progenitors remodel the *Drosophila* airways during metamorphosis. *Development*. 2010, vol.137, p.3615-24.

Poodry CA. shibire, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol*. 1990, vol.138, p.464-72.

Poulson DF. Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1937, vol.23, p.133-7.

Qi D, Bergman M, Aihara H, Nibu Y, Mannervik M. *Drosophila* Ebi mediates Snail-dependent transcriptional repression through HDAC3-induced histone deacetylation. *EMBO J*. 2008, vol.27, p.898-909.

Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*. 2000, vol.28, p.69-80.

Reece-Hoyes JS, Deplancke B, Barrasa MI, Hatzold J, Smit RB, Arda HE, Pope PA, Gaudet J, Conradt B, Walhout AJ. The *C. elegans* Snail homolog CES-1 can activate gene expression in vivo and share targets with bHLH transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 2009, vol. 37, p.3689-98.

Reichardt I, Knoblich JA. Cell biology: Notch recycling is numbed. *Curr Biol*. 2013, vol.23, R270-2.

Remaud S, Audibert A, Gho M. S-phase favours notch cell responsiveness in the *Drosophila* bristle lineage. *PLoS One*. 2008, vol.3, e3646.

Rembold M, Ciglar L, Yáñez-Cuna JO, Zinzen RP, Girardot C, Jain A, Welte MA, Stark A, Leptin M, Furlong EE. A conserved role for Snail as a potentiator of active transcription. *Genes Dev*. 2014, vol.28, p.167-81.

Rhyu MS, Jan LY, Jan YN. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell*. 1994, vol.76, p.477-91.

Roark M, Sturtevant MA, Emery J, Vaessin H, Grell E, Bier E. scratch, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev*. 1995, vol.9, p.2384-98.

Roegiers F, Jan LY, Jan YN. Regulation of membrane localization of Sanpodo by lethal giant larvae and neuralized in asymmetrically dividing cells of *Drosophila* sensory organs. *Mol Biol Cell*. 2005, vol.16, p.3480-7.





Sakai D, Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development*. 2006, vol.133, p.1323-33.

Sakata T, Sakaguchi H, Tsuda L, Higashitani A, Aigaki T, Matsuno K, Hayashi S. *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol*. 2004, vol.14, p.2228-36.

Santolini E, Puri C, Salcini AE, Gagliani MC, Pelicci PG, Tacchetti C, Di Fiore PP. Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol*. 2000, vol.151, p.1345-52.

Sasamura T, Sasaki N, Miyashita F, Nakao S, Ishikawa HO, Ito M, Kitagawa M, Harigaya K, Spana E, Bilder D, Perrimon N, Matsuno K. neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development*. 2003, vol.130, p.4785-95.

Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 1997, vol.137, p.1403-19.

Schmid A, Chiba A, Doe CQ. Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development*. 1999, vol.126, p.4653-89.

Schneider M, Troost T, Grawe F, Martinez-Arias A, Klein T. Activation of Notch in *lgd* mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome. *J Cell Sci*. 2013, vol.126, p.645-56.

Schober M, Schaefer M, Knoblich JA. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 1999, vol.402, p.548-51.

Schwartz C, Locke J, Nishida C, Kornberg TB. Analysis of cubitus interruptus regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development*. 1995, vol.121, p.1625-35.

Schweisguth F, Posakony JW. Suppressor of Hairless, the *Drosophila* homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell*. 1992, vol.69, p.1199-212.

Segalen M, Bellaïche Y. Cell division orientation and planar cell polarity pathways. *Semin Cell Dev Biol*. 2009, vol.20, p.972-7.

Seher TC, Leptin M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol*. 2000, vol.10, p.623-9.

Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development*. 1989, vol.106, p.809-16.

Seugnet L, Simpson P, Haenlin M. Transcriptional regulation of Notch and Delta: requirement for neuroblast segregation in *Drosophila*. *Development*. 1997, vol.124, p.2015-25.



Seugnet L, Simpson P, Haenlin M. Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol.* 1997b, vol.192, p.585-98.

Shen CP, Jan LY, Jan YN. Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell.* 1997, vol.90, p.449-58.

Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrissey EE, Temple S. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci.* 2006, vol.9, p.743-51.

Shi S, Stanley P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, vol.100, p.5234-9.

Siller KH, Cabernard C, Doe CQ. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol.* 2006, vol.8, p.594-600

Simon F, Fichelson P, Gho M, Audibert A. Notch and Prospero repress proliferation following cyclin E overexpression in the *Drosophila* bristle lineage. *PLoS Genet.* 2009, vol.5, e1000594.

Singson A, Leviten MW, Bang AG, Hua XH, Posakony JW. Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev.* 1994, vol.8, p.2058-71.

Skeath JB, Carroll SB. Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development.* 1992, vol.114, p.939-46.

Smith CA, Lau KM, Rahmani Z, Dho SE, Brothers G, She YM, Berry DM, Bonneil E, Thibault P, Schweisguth F, Le Borgne R, McGlade CJ. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 2007, vol.26, p.468-80.

Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009, vol.10, p.609-22.

Southall TD, Brand AH. Neural stem cell transcriptional networks highlight genes essential for nervous system development. *EMBO J.* 2009, vol.28, p.3799-807.

Srivastava A, Pastor-Pareja JC, Igaki T, Pagliarini R, Xu T. Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, vol.104, p.2721-6.

Streit A, Bernasconi L, Sergeev P, Cruz A, Steinmann-Zwicky M. mgm 1, the earliest sex-specific germline marker in *Drosophila*, reflects expression of the gene esg in male stem cells. *Int J Dev Biol.* 2002, vol.46, p.159-66.

Struhl G. A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature.* 1981, vol.292, p.635-8.



Sun X, Artavanis-Tsakonas S. Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development*. 1997, vol.124, p.3439-48.

Tabata T, Kornberg TB. Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell*. 1994, vol.76, p.89-102.

Tabata T, Schwartz C, Gustavson E, Ali Z, Kornberg TB. Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development*. 1995, vol.121, p.3359-69.

Tao G, Levay AK, Gridley T, Lincoln J. Mmp15 is a direct target of Snai1 during endothelial to mesenchymal transformation and endocardial cushion development. *Dev Biol*. 2011, vol.359, p.209-21.

Tichy AL, Ray A, Carlson JR. A new *Drosophila* POU gene, pdm3, acts in odor receptor expression and axon targeting of olfactory neurons. *J Neurosci*. 2008, vol.28, p.7121-9.

Trainor PA, Krumlauf R.

Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2000, vol.1, p.116-24.

Tran KD, Doe CQ. Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development*. 2008, vol.135, p.3491-9.

Tripura C, Chandrika NP, Susmitha VN, Noselli S, Shashidhara LS. Regulation and activity of JNK signaling in the wing disc peripodial membrane during adult morphogenesis in *Drosophila*. *Int J Dev Biol*. 2011, vol.55, p.583-90.

Upadhyay A, Kandachar V, Zitserman D, Tong X, Roegiers F. Sanpodo controls sensory organ precursor fate by directing Notch trafficking and binding  $\gamma$ -secretase. *J Cell Biol*. 2013, vol.201, p.439-48.

Vaccari T, Bilder D. The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell*. 2005, vol.9, p.687-98.

Vaccari T, Lu H, Kanwar R, Fortini ME, Bilder D. Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 2008, vol.180, p.755-62.

Varnum-Finney B, Wu L, Yu M, Brashem-Stein C, Staats S, Flowers D, Griffin JD, Bernstein ID. Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling. *J Cell Sci*. 2000, vol.113, p.4313-8.

Voog J, D'Alterio C, Jones DL. Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Nature*. 2008, vol.454, p.1132-6.

Voog J, Sandall SL, Hime GR, Resende LP, Loza-Coll M, Aslanian A, Yates JR, Hunter T, Fuller MT, Jones DL. Escargot restricts niche cell to stem cell conversion in the *Drosophila* testis. *Cell Rep*. 2014, vo.7, p.722-34.



Wang W, Struhl G. Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development*. 2005, vol.132, p.2883-94.

Wang XQ, Zhang W, Lui EL, Zhu Y, Lu P, Yu X, Sun J, Yang S, Poon RT, Fan ST. Notch1-Snail1-E-cadherin pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2012, vol.131, p.163-72.

Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 1999, vol.402, p.544-7.

Wilkin MB, Carbery AM, Fostier M, Aslam H, Mazaleyrat SL, Higgs J, Myat A, Evans DA, Cornell M, Baron M. Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr Biol*. 2004, vol.14, p.2237-44.

Wilson JJ, Kovall RA. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell*. 2006, vol.124, p.985-96.

Wilson AA, Kotton DN. Another notch in stem cell biology: *Drosophila* intestinal stem cells and the specification of cell fates. *Bioessays*. 2008, vol.30, p.107-9.

Xu Q, Mellitzer G, Wilkinson DG. Roles of Eph receptors and ephrins in segmental patterning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000, vol.355, p.993-1002.

Yang DJ, Chung JY, Lee SJ, Park SY, Pyo JH, Ha NC, Yoo MA, Park BJ. Slug, mammalian homologue gene of *Drosophila* escargot, promotes neuronal-differentiation through suppression of HEB/daughterless. *Cell Cycle*. 2010, vol.9, p.2789-802.

Yu TW, Bargmann CI. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci*. 2001, vol.4, p.1169-76.

Zacharioudaki E, Bray SJ. Tools and methods for studying Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. *Methods*. 2014, vol.68, p.173-82.

Zander MA, Burns SE, Yang G, Kaplan DR, Miller FD. Snail coordinately regulates downstream pathways to control multiple aspects of mammalian neural precursor development. *J Neurosci*. 2014, vol.34, p.5164-75.







**Titre:** Détermination neurale et neuronale: implication des protéines de la superfamille Snail dans le lignage des soies mécanosensorielles chez la drosophile

L'engagement des cellules vers un destin donné, ou détermination cellulaire, est un processus clé du développement. Quels sont les mécanismes qui sous-tendent la détermination cellulaire ? Pour aborder cette question, nous utilisons le lignage des soies mécanosensorielles de la drosophile. Dans ce lignage, la diversité des cellules résulte de l'activation différentielle de la voie Notch ainsi que la ségrégation asymétrique de déterminants cellulaires à chaque division. Cependant, comment la répétition d'un même mécanisme peut-elle être à l'origine des destins cellulaires différents ? D'autres facteurs doivent être impliqués dans ce processus. Afin de les identifier, mon intérêt s'est porté sur les facteurs de transcription de la superfamille Snail, connus pour être impliqués dans la détermination cellulaire au cours du développement de la drosophile.

Deux membres de cette superfamille, Escargot (Esg) et Scratch (Scrt) sont exprimés dans le lignage des soies, en particulier dans les cellules neurales et leurs précurseurs. Des analyses de perte et de gain de fonction indiquent qu'Esg et Scrt, agissant de manière redondante, sont nécessaires pour le maintien de l'identité du précurseur secondaire neural. Des tests d'interaction génétique ont montré que ces facteurs agissent en interaction avec la voie Notch, probablement via la répression de l'expression des gènes cibles de la voie. De plus, Esg, mais pas Scrt, a un rôle supplémentaire lors de la formation du lignage des soies. La perte de fonction de ce facteur provoque un défaut de l'arborisation et de la croissance axonales. En outre, l'expression des gènes impliqués dans la différenciation neuronale, tels que Elav et Prospero, est altérée dans ce contexte, suggérant qu'Esg contrôle la différenciation neuronale en régulant l'expression de gènes clés de l'identité neuronale. Ensemble, mes résultats ont montré qu'Esg et Scrt participent à la mise en place de la diversité cellulaire dans le lignage des soies de la drosophile.

**Titre:** Neural and neuronal determination: involvement of Snail superfamily proteins in Drosophila bristle cell lineage

The commitment of cells to a given fate, or cell fate determination, is a key process in development. Cell type diversity arises from variations in this process. What are the mechanisms underlying cell determination and how is cell diversity achieved? In order to approach these questions, we use the Drosophila mechanosensory bristle lineage. In this lineage, cell diversity arises from the differential activation of the Notch pathway as well as the asymmetric segregation of cell fate determinants at each division. However, how does the repetition of the same mechanism trigger different cell fates? Other factors might be involved in cell fate commitment. In order to identify such factors, I focused my interest on the transcription factor of the Snail superfamily, known to be involved in cell determination during Drosophila development.

Two members of this superfamily, escargot (esg) and scratch (scrt) are expressed in the bristle lineage, specifically in the inner neural cells and their precursor cells. Loss and gain of function analysis indicate that Esg and Scrt, acting redundantly, are necessary for the maintenance of the neural secondary precursor cell identity. A genetics interaction test showed that this role is achieved in interaction with the Notch pathway, probably through the repression of Notch target genes expression. Moreover, Esg, but not Scrt, has an additional role during the inner bristle cell formation. Loss of function of this factor induces a defect in neuronal differentiation, specifically axon growth and patterning. Moreover, the expression of genes involved in neuronal differentiation, such as elav and prospero, is impaired in this context. Altogether, these data suggests that Esg is involved in neuronal differentiation by regulating the expression of key neuronal genes. Together, my results showed that Esg and Scrt participate to the establishment of cell diversity in Drosophila bristle cell lineage.